

中国汉族人群PNPLA3 rs738409(C>G)基因多态性与肝硬化病因学的相关性

王心怡, 李丹, 李异玲

王心怡, 李丹, 李异玲, 中国医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省沈阳市 110001

王心怡, 在读硕士, 主要从事消化系统疾病的研究。

辽宁省科技厅基金资助项目, No. 2011225015

沈阳市科技厅基金资助项目, No. F13-220-9-61

作者贡献分布: 此课题由李异玲设计; 研究过程由王心怡与李丹操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由李异玲提供; 数据分析由王心怡完成; 本论文写作由王心怡完成。

通讯作者: 李异玲, 教授, 主任医师, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京街155号, 中国医科大学附属第一医院消化内科。lyl-72@163.com

电话: 021-52983057

收稿日期: 2015-06-06 修回日期: 2015-06-30

接受日期: 2015-07-06 在线出版日期: 2015-08-18

Association between patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 rs738409(C>G) single nucleotide polymorphism and etiology of liver cirrhosis in a Chinese Han population

Xin-Yi Wang, Dan Li, Yi-Ling Li

Xin-Yi Wang, Dan Li, Yi-Ling Li, Department of Gastroenterology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by: Science and Technology Agency Foundation of Liaoning Province, No. 2011225015; Science and Technology Agency Foundation of Shenyang City, No. F13-220-9-61

Correspondence to: Yi-Ling Li, Professor, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the First Hospital of China Medical University, 155 Nanjing Street, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. lyl-72@163.com

Received: 2015-06-06 Revised: 2015-06-30

Accepted: 2015-07-06 Published online: 2015-08-18

Abstract

AIM: To determine whether patatin-like phospholipase

domain-containing protein 3 (PNPLA3) rs738409 single nucleotide polymorphism (SNP) affects the severity of hepatic damage, susceptibility and prognosis of liver cirrhosis with various liver diseases.

METHODS: We enrolled 224 Chinese Han patients diagnosed with liver cirrhosis, of whom 88 had hepatitis B virus (HBV)-related cirrhosis, 83 had alcoholic liver cirrhosis and 53 had hepatitis C virus (HCV)-related cirrhosis. Two hundred healthy volunteers were enrolled as a control group. TaqMan genotyping assay was used to investigate the association of PNPLA3 SNPs (rs738409) with the risk of liver cirrhosis.

RESULTS: The G allele of the PNPLA3 I148M variant was significantly different between alcoholic liver cirrhosis and the control (OR = 1.902, $P < 0.001$), and was associated with HBV-related liver cirrhosis (OR = 1.452, $P = 0.047$). There was no significant association between PNPLA3 rs738409 genotype and HCV-related cirrhosis ($P = 0.056$). There was no correlation between PNPLA3 rs738409 genotype and liver cirrhosis with hepatocellular carcinoma ($P = 0.965$).

CONCLUSION: PNPLA3 rs738409 C>G is associated with alcoholic liver cirrhosis and HBV-related liver cirrhosis in a Chinese Han population.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Patatin-like phospholipase domain-

■背景资料

patatin样磷脂酶域3(patatin-like phospholipase domain-containing protein 3, PNPLA3)又称为脂肪营养素。大量研究显示PNPLA3 I148M rs738409与肝病脂肪变性及纤维化进程存在显著遗传特性,与酒精性肝硬化易感性显著相关,目前缺乏PNPLA3 I148M在中国汉族人群中与肝硬化病因学的相关性研究。

■同行评议者

梁国刚, 教授, 大连医科大学附属第一医院

■ 研究前沿

研究认为PNPLA3 I148M rs738409 C>G与中国汉族酒精性肝硬化易感性相关, 同时与乙型肝炎肝硬化易感性可能相关. 本研究是目前第1篇探究PNPLA3 I148M与中国汉族肝硬化病因学相关性的研究.

containing protein 3 I148M; Liver cirrhosis; Hepatocellular carcinoma

Wang XY, Li D, Li YL. Association between patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 rs738409(C>G) single nucleotide polymorphism and etiology of liver cirrhosis in a Chinese Han population. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(23): 3691-3699 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/3691.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i23.3691>

摘要

目的: 探究在中国汉族人群中, 含patatin样磷脂酶域3(patatin-like phospholipase domain-containing protein 3, *PNPLA3*) I148M基因变异与酒精性肝硬化、慢性乙型病毒性肝炎肝硬化及慢性丙型病毒性肝炎肝硬化易感性及肝脏损伤程度、预后是否存在相关性.

方法: 本研究纳入224例中国汉族酒精性肝硬化、慢性丙型病毒性肝炎肝硬化、慢性乙型病毒性肝炎肝硬化患者, 其中, 慢性乙型病毒性肝炎肝硬化患者88例, 酒精性肝硬化患者83例, 慢性丙型病毒性肝炎肝硬化患者53例及200名健康人群作为对照组. 采用探针法基因分型检测PNPLA3 rs738409与肝硬化之间的相关性.

结果: PNPLA3 I148M rs738409 G等位基因型在酒精性肝硬化(OR = 1.902, $P < 0.001$)及慢性乙型肝炎肝硬化(OR = 1.452, $P = 0.047$)与健康对照组中的频率分布存在显著差异; 丙型肝炎肝硬化与健康对照组中的等位基因频率分布差异无统计学意义($P = 0.056$). 并未得出PNPLA3 I148M rs738409 C>G与肝硬化原发性肝细胞癌相关($P = 0.965$).

结论: PNPLA3 rs738409 C>G在中国汉族人群中与酒精性肝硬化及慢性乙型肝炎肝硬化易感性存在相关性.

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有.

关键词: patatin样磷脂酶域3 I148M; 肝硬化; 肝癌

核心提示: 在中国汉族人群中, patatin样磷脂酶域3(patatin-like phospholipase domain-containing protein 3, *PNPLA3*) I148M基因变异与酒精性肝硬化呈现显著相关, 同时与乙型肝炎肝硬化易感性可能相关, 并未得出PNPLA3 I148M与丙型肝炎肝硬化及原发性肝癌易感性存在相关性, 考虑样本量较少.

王心怡, 李丹, 李异玲. 中国汉族人群PNPLA3 rs738409(C>G)基因多态性与肝硬化病因学的相关性. *世界华人消化杂志* 2015; 23(23): 3691-3699 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/3691.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i23.3691>

0 引言

据2009年流行病学统计显示^[1]: 中国目前病毒性肝炎发病率较高, 其中慢性乙型肝炎患者占全世界肝炎总数的80%左右, 其中演变为肝硬化为0.4%-14.2%; 丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染后约80%将转变为慢性, 演变为肝硬化的比例更高; 除中年人外, 老年人酒精性肝硬化发病率也很高, 近年来肝硬化年发病率为17/10万, 已对国民经济发展和人们健康造成重大影响.

全基因组学研究^[2,3]发现: 第22号染色体patatin样磷脂酶域3(patatin-like phospholipase domain-containing protein 3, *PNPLA3*)基因的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)(rs738409 C/G), 致148位异亮氨酸被蛋氨酸取代. *PNPLA3*主要表达于人体脂肪组织、肝、肌肉、骨骼、皮肤及巨噬细胞中, 尤其在肝组织中表达最高. 目前实验模型对PNPLA3-I148M变异的生物学功能提出如下假设: (1)PNPLA3-I148M变异降低了甘油三酯水解酶的活性; (2)PNPLA3-I148M变异阻碍了其他脂肪酶的活性; (3)该变异可以阻断甘油三酯稳态的某个必要因子; (4)PNPLA3-I148M变异可能产生一种抑制脂肪水解活性功能的新信号分子; (5)PNPLA3-I148M促进了甘油三酯的合成^[4]. 目前关于PNPLA3在体内的生物学功能尚未明确.

自2008年, Romeo等^[5]通过对“达拉斯心脏研究”(Dallas Heart Study, DHS)在西班牙人、非洲人及欧美人中展开全基因组分析显示: PNPLA3 I148M(rs738409)在西班牙人中与血清ALT水平存在明显相关性; 大量研究显示^[6-15]: PNPLA3 I148M与酒精性肝硬化、慢性丙型病毒性肝炎肝硬化及肝细胞癌易感性存在相关性. 该基因变异在中国汉族人群中是否也存在与肝脏损伤、肝硬化及肝癌间的相关性, 目前仍缺乏研究证明.

1 材料和方法

1.1 材料 研究纳入224例常住于辽宁省地区, 符

合肝硬化诊断标准^[16-18], 经由全腹计算机断层扫描(computed tomography, CT)或肝胆脾彩超证实, 自2012-01/2015-03于中国医科大学附属第一医院消化内科住院就诊的中国汉族患者, 纳入标准: 病例组的选择: 来源于中国医科大学附属第一医院消化内科就诊的肝硬化患者, 无血缘关系。排除标准: (1)药物、毒物、长期胆汁淤积、肝淤血、遗传和代谢疾病、血吸虫病所致肝硬化; (2)非原发性肝癌(肝转移癌); 胆管细胞癌; (3)不同意进行基因学研究; (4)年龄未满18岁。由肝硬化病因学分为3组: 慢性乙型肝炎肝硬化患者88例(并发原发性肝癌患者18例), 酒精性肝硬化患者83例, 慢性丙型肝炎肝硬化患者53例(并发原发性肝癌患者6例)。原发性肝癌由影像学诊断或术中病理诊断。同时纳入200例中国汉族无血缘关系的健康对照组, 由中国医科大学附属第一医院体检中心纳入。研究经过中国医科大学伦理委员会通过, 所有受试者均签署知情同意书。材料: PCR引物及探针: TaqMan探针(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)、基因组DNA提取试剂盒(Promega, Madison, WI, USA)。

1.2 方法

1.2.1 体格检查及生化学指标检测: 纳入病例均完善个人资料, 包括年龄、性别、饮酒史、既往疾病史。均空腹8 h以上, 静脉采血前3 d低脂饮食, 肘静脉采血20 mL, 按临床实验室标准进行生化学检测, 测定血常规、总胆红素、血清门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)水平、血糖、血脂、血胰岛素水平。

1.2.2 DNA提取及基因分型(DNA聚类分析): 血样先行EDTA抗凝, 冻存于-20 °C冰箱中, 应用DNA快速提取试剂盒进行DNA提取, 微量DNA检测仪检测DNA浓度, pH 7.5 TE稀释使DNA浓度保持在25-50 ng/mL。通过 $A_{260/280}$ 比值检测DNA纯度(1.6-1.8), 同时进行琼脂糖电泳进一步确认质量。以上DNA经纯度鉴定后, 取2.5 mL置于384孔板中, 离心后加入反应混合液2.5 mL(包括Fam、Vic荧光标记的一对探针、一对引物、dNTP、Buffer、Taq polymerase), 反应总体积为5 mL, 应用ABI公司7900HT进行RT-PCR检测。

统计学处理 采用SPSS21.0版本进行统计

学分析。定量数据采用mean±SD或中位数描述, 连续变量采用曼-惠特尼U检验, 分类变量采用 χ^2 检验(如性别、饮酒史等), χ^2 检验同时用于检测基因分型是否符合Hardy-Weinberg定理。组间比较采用方差分析, 组间多重比较采用SNK法(或LSD法); 二元逻辑回归模型用于估算相对危险度及校正优势比。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象基本情况 研究对象的基本情况及其生化学指标(表1)。研究对象的基因分型根据探针荧光标记的不同, 将检测结果分成3种基因型, 蓝色代表PNPLA3 GG基因型, 绿色代表PNPLA3 CG基因型, 红色代表PNPLA3 CC基因型(图1)。健康对照组的年龄均值明显低于病例组($P<0.001$)。同时, 病例组与健康对照组的ALT、AST、血清白蛋白(serum albumin, ALB)、血清总胆红素(serum total bilirubin, TBIL)也存在明显差异($P<0.001$)。健康对照组($n=200$)中C=0.693, G=0.308, C/C=47%, C/G=44.5%, G/G=8.5%; 病例组($n=224$)中C=0.58, G=0.419, C/C=34.3%, C/G=47.3%, G/G=18.3%。以健康对照组C等位基因频率作为参照, 病例组G等位基因频率存在显著差异(OR=1.628, 95%CI: 1.227-2.162, $P=0.001$)。将健康对照组C/C基因型作为参照, 病例组G/G基因型存在显著差异(OR=2.944, 95%CI: 1.551-5.587, $P=0.001$)。对照组及病例组的基因型频率均符合Hardy-Weinberg平衡($P_{\text{病例组}}=0.182$, $P_{\text{健康对照组}}=0.403$)。比较在肝硬化病例组是否发生原发性肝细胞癌中的PNPLA3 rs738409等位基因频率, 结果示差异统计学意义($P=0.965$)。

2.2 病例组中PNPLA3 rs738409 C>G基因多态性的频率 检测PNPLA3 rs738409等位基因及基因型频率示: 酒精性肝硬化($n=83$)中C=0.542, G=0.458, C/C=36.1%, C/G=36.1%, G/G=27.7%; 乙型肝炎肝硬化($n=88$)中C=0.608, G=0.392, C/C=31.8%, C/G=58.0%, G/G=10.2%; 丙型肝炎肝硬化($n=53$)中C=0.594, G=0.406, C/C=35.8%, C/G=47.1%, G/G=16.9%。酒精性肝硬化病例组中的G等位基因及G/G基因分型频率明显高于病毒性肝炎肝硬化。通过 χ^2 检验发现酒精性肝硬化及乙型

■ 相关报道

Tong等首次研究PNPLA3 I148M在中国汉族人群与乙型肝炎肝硬化易感性的相关性; Guyot等通过长期随访研究发现: PNPLA3 I148M rs738409基因多态性与酒精性肝硬化患者相关, 与丙型肝炎肝硬化易感性无关, 是肝细胞癌较高的一个危险因素。

■ 创新盘点

本文首次在中国汉族肝硬化、肝细胞癌患者中观察*PNPLA3* I148M基因临床表型与病因学的相关性。

表 1 患者基本情况

参数	ALD(<i>n</i> = 83)	CHB(<i>n</i> = 88)	CHC(<i>n</i> = 53)	健康对照组(<i>n</i> = 200)
男/女	81/2	70/18	35/18	80/120
年龄	52.650 ± 9.577	55.090 ± 10.059	57.150 ± 8.994	41.880 ± 13.127
ALT(IU/L)	29.00(6.00–356.00)	33.50(4.00–612.00)	50.00(11.00–463.00)	15.00(6.00–73.00)
AST(IU/L)	50.00(10.00–439.00)	53.00(12.00–747.00)	65.00(14.00–391.00)	19.00(12.00–37.00)
TBIL(μmol/L)	28.90(4.10–335.00)	29.70(8.10–558.00)	23.10(4.90–115.50)	10.45(3.80–34.20)
ALB(g/L)	29.10(20.00–53.50)	29.10(19.00–52.00)	33.20(19.60–130.70)	67.00(23.00–152.00)

ALT: 丙氨酸氨基转移酶; AST: 门冬氨酸氨基转移酶; TBIL: 血清总胆红素; ALB: 血清白蛋白; ALD: 酒精性肝病; CHB: 慢性乙型肝炎; CHC: 慢性丙型肝炎。

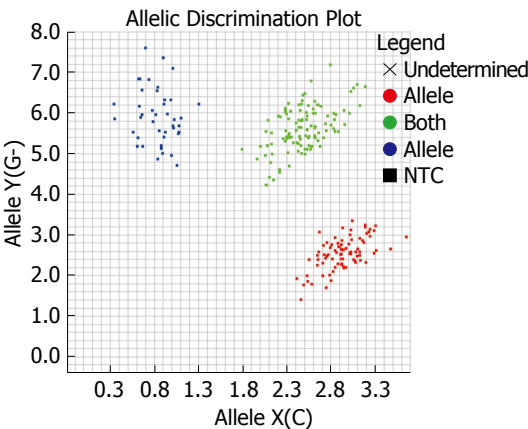


图 1 DNA聚类图。

肝炎肝硬化病例组的G等位基因频率与对照组间差异有统计学意义; 而慢性丙型肝炎肝硬化与对照组间无显著统计学差异($P_{\text{ALD}} < 0.001$, $P_{\text{CHB}} = 0.047$, $P_{\text{CHC}} = 0.056$)。以携带G等位基因分组, 将Child分级得分分为<7分组及≥7分组, 分别检测各病例组间Child分级是否存在统计学差异, 结果差异未见明显统计学意义($P_{\text{ALD}} = 0.341$, $P_{\text{CHB}} = 0.7$, $P_{\text{CHC}} = 0.911$)。其余临床参数差异未见明显统计学意义(表2)。

2.3 *PNPLA3* rs738409 C>G基因多态性与酒精性肝硬化的相关性 酒精性肝硬化病例组中*PNPLA3* rs738409 C>G G/G基因型频率与健康对照组相比存在显著差异($\text{OR} = 4.239$, 95%CI: 2.003–8.971, $P < 0.001$)。酒精性肝硬化携带*PNPLA3* G/G基因型与C/G基因型相比, OR_{GG} 明显大于 OR_{CG} 。

2.4 *PNPLA3* rs738409 C>G基因多态性与慢性乙型肝炎肝硬化相关性 慢性乙型肝炎肝硬化病例组中*PNPLA3* rs738409 C>G C/G基因型频率与健康对照组相比差异存在统计学意义

($\text{OR} = 1.98$, 95%CI: 1.115–3.516, $P = 0.019$)。但未在G/G基因型中观察到差异无统计学意义($P = 0.34$)。考虑乙型肝炎肝硬化病例组中并未完全排除有饮酒史患者, 故以饮酒史进行分组, 分别进行G等位基因频率统计学分析差异未见明显统计学意义($P = 0.321$)。对比饮酒组与非饮酒组各临床参数, 除ALB外, 其余差异均无统计学意义。但二者并无相关($P = 0.057$)。TBIL在G等位基因携带中表现出统计学差异($P = 0.039$), 但二者并未表现出明显相关性($P = 0.258$, Spearman相关系数 = 0.122)(表3)。

2.5 *PNPLA3* rs738409 C>G基因多态性与慢性丙型肝炎肝硬化相关性 慢性丙型肝炎肝硬化病例组中, G等位基因频率与健康对照组无明显差异, 考虑丙型肝炎肝硬化病例组中并未完全排除有饮酒史患者, 故以饮酒史进行分组, 分别进行G等位基因频率统计学分析, 无明显差异($P = 0.737$)。对比饮酒组与非饮酒组各临床参数之间有差异无统计学意义(表3)。饮酒组与非饮酒组仅有TBIL存在统计学差异, 但其与饮酒仅为低度正相关(Spearman相关系数 = 0.328)。

3 讨论

*PNPLA3*又称为脂肪营养素, 属于patatin样磷脂酶家族^[19]。关于体外重组人*PNPLA3*的研究^[20]发现: *PNPLA3*通过酰基辅酶A通路参与酰基甘油酯转酰基作用及甘油三酯水解。大量研究^[6,10,21,22]显示*PNPLA3* I148M rs738409与肝病脂肪变性及纤维化进程存在显著遗传特性。此次试验着重探究了在中国汉族人群中rs738409变异与肝硬化的相关性。

实验研究发现: 在中国汉族人群中, *PNPLA3*

表 2 各病例组临床参数与G等位基因的关系比较

分组	参数	携带G等位基因者	非携带G等位基因者	P值
ALD	性别(男/女)	52/1	29/1	1.000 ²
	年龄	52.300 ± 9.965	53.270 ± 8.982	0.662
	ALT(IU/L)	25.00(8.00–356.00)	38.00(6.00–253.00)	0.702
	AST(IU/L)	52.00(16.00–439.00)	46.50(10.00–280.00)	0.754
	GGT(IU/L)	109.00(12.00–2263.00)	79.00(11.00–1587.00)	0.606
	TBIL(μmol/L)	31.40(8.30–335.00)	25.45(4.10–307.50)	0.696
	ALB(g/L)	28.30(20.00–53.50)	29.55(21.00–40.60)	0.872
	INR	1.410(0.890–2.430)	1.220(0.970–1.620)	0.052 ¹
CHB	性别(男/女)	49/11	21/7	0.470 ²
	年龄	54.750 ± 9.524	55.820 ± 11.271	0.644
	ALT(IU/L)	34.00(8.00–612.00)	27.00(4.00–303.00)	0.399
	AST(IU/L)	64.00(14.00–747.00)	44.00(12.00–505.00)	0.669
	GGT(IU/L)	70.00(11.00–783.00)	50.00(14.00–338.00)	0.253
	TBIL(μmol/L)	29.70(8.30–558.00)	27.05(8.10–154.60)	0.039 ¹
	ALB(g/L)	30.15(20.20–52.00)	27.40(19.00–42.60)	0.321
	INR	1.360(1.00–3.940)	1.330(0.920–1.820)	0.186
CHC	性别(男/女)	12/22	13/6	0.021 ²
	年龄	56.150 ± 8.624	62.00 ± 9.594	0.281
	ALT(IU/L)	46.00(11.00–463.00)	60.00(13.00–167.00)	0.425
	AST(IU/L)	65.00(14.00–391.00)	65.50(16.00–148.00)	0.254
	GGT(IU/L)	80.50(14.00–530.00)	42.00(11.00–854.00)	0.456
	TBIL(μmol/L)	25.05(4.90–115.50)	21.50(11.20–47.50)	0.076 ¹
	ALB(g/L)	33.55(19.70–130.70)	33.20(19.60–42.60)	0.604
	INR	1.135(0.810–2.480)	1.220(0.970–1.620)	0.414 ¹

¹采用独立样本t检验; ²采用卡方检验, 其余采用方差分析. ALT: 丙氨酸氨基转移酶; AST: 门冬氨酸氨基转移酶; GGT: γ-谷氨酰转氨酶; TBIL: 血清总胆红素; ALB: 血清白蛋白; ALD: 酒精性肝病; CHB: 慢性乙型病毒性肝炎; CHC: 慢性丙型病毒性肝炎. INR: 国际标准化比值.

I148M基因变异与酒精性肝硬化呈现显著相关. 此项结论已有大量研究先后在意大利人^[7,8]、英国人^[9]、德国人^[10]、欧洲人^[11,12,21]、欧美混血人群^[13]、印度人^[14]等种族中得到证实. 实验中发现, 酒精性肝硬化患者携带GG等位基因与携带CG型患者相比, OR值显著升高; 同时在Chamorro等^[23]的Meta分析中得到证实, 尤其携带GG基因型的个体较CC基因型罹患酒精性肝硬化的危险度高出近乎4倍. Burza等^[8]在对384例意大利酒精摄入危险量者(每日酒精摄入量为男性≥36 g; 女性≥24 g)的研究中发现: 在酒精摄入为危险量时, 同为*PNPLA3* I148M基因突变者中, 年长者(≥24岁)中酒精性肝硬化发病率高于年轻者(<24岁).

近期研究显示*PNPLA3* I148M变异与慢性丙型病毒性肝炎肝硬化患者间存在显著相关^[6,7,15], 但有趣的是, 这一结论在Nischalke等^[11]、Guyot等^[12]、Nakamura等^[24]的研究中并未得到证

实. 实验中发现中国汉族人群中慢性丙型肝炎肝硬化易感性与*PNPLA3* I148M变异无明显相关. 考虑实验存在一定局限性, 样本量过少. Valenti等^[25]研究发现适量但存在潜在危害的酒精摄入者中, *PNPLA3* I148M基因多态性对于肝脏脂肪样变性 & 肝损伤的直接影响取决于每日摄入的酒精量. 一些学者猜想*PNPLA3* 基因型或许是由于酒精摄入而对肝损伤施以影响. 然实验中未发现*PNPLA3* I148M基因变异携带者中饮酒者与非饮酒者间存在显著差异, 考虑实验对象均无长期大量饮酒史(饮酒史>5年, 男≥40 g/d, 女≥20 g/d, 或2 wk内有大量饮酒史, 折合成乙醇量>80 g/d), 乙醇所致肝脏损伤可能不敏感. *PNPLA3* I148M rs738409 C>G是否可以作为丙型肝炎肝硬化易感性的一个独立于其他变量的危险因素, 如酒精摄入, 还有待大样本实验证实.

本实验发现中国汉族乙型肝炎肝硬化易

应用要点
是否可将*PNPLA3* I148M纳入常规基因筛查, 协助肝硬化治疗及评估预后, 是否可考虑加用他汀类药物或减轻体质量以协助预防原发性肝癌发展, 还有待大样本实验证实.

同行评价

本文立意清晰，结构合理，尤其是以我国常见性危害性疾病“肝硬化”为研究对象，具有深远的临床转化意义。实验通过深层次的基因结构研究肝硬化的相关病因以及和原发性肝癌的因果关系，实验方法设计合理，具有一定的科学前景。

表 3 病毒性肝炎肝硬化饮酒组与非饮酒组临床各参数差异

参数	乙型肝炎肝硬化		P值	丙型肝炎肝硬化		P值
	饮酒组	非饮酒组		饮酒组	非饮酒组	
性别(男/女)	32/0	38/18	<0.001 ²	17/0	18/18	<0.001 ²
年龄	51.160±6.648	57.340±11.000	0.644	55.180±7.876	58.080±9.437	0.276
ALT(IU/L)	35.00 (12.00–295.00)	32.50 (4.00–612.00)	0.221 ¹	78.00 (11.00–463.00)	45.50 (13.00–302.00)	0.094
AST(IU/L)	47.00 (17.00–505.00)	62.00 (12.00–747.00)	0.884	82.00 (26.00–391.00)	50.00 (14.00–273.00)	0.061 ¹
GGT(IU/L)	83.00 (21.00–783.00)	52.00 (11.00–399.00)	0.086 ¹	100.00 (11.00–854.00)	42.00 (14.00–461.00)	0.106 ¹
TBIL(μmol/L)	34.00 (8.10–154.60)	27.90 (8.70–558.00)	0.114 ¹	33.00 (9.90–115.50)	20.50 (4.90–85.60)	0.032
ALB(g/L)	27.65 (19.00–38.60)	30.00 (19.10–52.00)	0.032	32.70 (19.60–130.70)	34.20 (19.70–41.10)	0.523 ¹
INR	1.400 (1.070–2.320)	1.325 (0.920–3.940)	0.967	1.270 (0.970–2.480)	1.120 (0.810–2.130)	0.081

¹采用独立样本t检验；²采用卡方检验，其余采用方差分析。ALT：丙氨酸氨基转移酶；AST：门冬氨酸氨基转移酶；GGT：γ-谷氨酰转氨酶；TBIL：血清总胆红素；ALB：血清白蛋白；ALD：酒精性肝病；CHB：慢性乙型病毒性肝炎；CHC：慢性丙型病毒性肝炎。INR：国际标准化比值。

感性与*PNPLA3* I148M存在相关性。与Tong等^[26]在对344例中国汉族乙型肝炎肝硬化的患者进行的研究中发现相反。早在意大利人群实验中已得到*PNPLA3*与乙型肝炎肝硬化脂肪变性及肝纤维化进展间并无相关性^[7]。然而，Brouwer等^[27]通过对531例进行有效肝活检的慢性乙型肝炎患者的研究中发现：*PNPLA3*基因多样性与肝脏脂肪样变性、脂肪性肝炎存在相关性，且独立于种族、病毒作用；与进行性肝纤维化不相关。也有研究^[28]显示*PNPLA3*与中国汉族慢性乙型病毒性肝炎的发生、发展存在相关性。由于实验存在一定的局限性，样本量过少，且同时未完全排除有饮酒史的患者。*PNPLA3*对脂肪变性的影响受内环境调控^[25]，且酒精也是肝脏损伤的独立危险因素之一。故考虑实验结论可能为酒精对肝脏的作用叠加所致，然而饮酒者与非饮酒者其G等位基因频率及临床各参数均无显著统计学差异。近期研究^[29-31]显示大约有1/3的慢性乙型肝炎患者同时发现患有NAFLD，而10-29%的脂肪性肝炎患者可能于10年内进展为肝硬化^[32]。目前考虑*PNPLA3* I148M与中国汉族人群乙型肝炎肝硬化存在相关性，但*PNPLA3* I148M与慢性乙型肝炎肝硬化易感性是否独立相关，*PNPLA3* I148M是否仅与严重脂肪样

变性且持续摄入酒精的慢性乙型肝炎肝硬化患者相关，是否存在其他混杂因素导致该阳性结果，还有待大样本实验证实。

实验并未得出*PNPLA3* I148M rs738409 C>G与肝硬化原发性肝细胞癌相关，考虑样本量过少。目前*PNPLA3* I148M基因变异与肝细胞癌相关性的研究大部分仍为小样本的病例对照，无法完全排除潜在偏移及混杂因素，故无法得出确定结论。Guyot等^[12]通过长期随访研究发现：*PNPLA3* I148M rs738409基因多态性与酒精性肝硬化患者相关，是肝细胞癌的一个较高的危险因素。但目前*PNPLA3* I148M如何参与调控肝细胞癌的机制还尚不清楚。研究显示^[33]携带*PNPLA3* I148M GG基因型的慢性乙型肝炎患者该基因变异与肝脏铁蛋白沉积独立相关；而肝脏铁蛋白与肝脏疾病进展及肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的发展相关^[34,35]。近来研究显示^[36]：*PNPLA3*在肝星状细胞中参与调控视黄醇活性、胰岛素及与脂滴含量呈负相关；*PNPLA3*在体内及体外均表现出视黄基棕榈酸酯酶活性；而I148M变异则缺乏该酶活性。同时体循环的视黄醇主要与RBP4相结合^[37]，RBP4的含量与体循环视黄醇显著相关^[38]。而148M等位基因的纯合子型相较148I，RBP4水平下降^[36]。*PNPLA3* 148M蛋

白由于酶活性缺乏, 诱导细胞内视黄醇滞留。视黄醇是由类维生素A在肠道内吸收并以视黄酯形式经由酯糜形式转运至肝细胞^[39]水解而得^[40]。类维生素A除了参与调控细胞的增殖及分化^[41,42], 同时还参与恶性肿瘤的治疗^[42,43]及防治肝细胞癌^[44,45]。此研究明确了PNPLA3 I148M在类维生素代谢中的重要作用, 同时对于PNPLA3如何影响肝纤维化及参与肝细胞癌予以重要启示。也有实验发现^[46], 在适量加用他汀类药物并不会加重肝病患者肝损伤, 实验观察到他汀类药物可降低HCC的风险(但仍需大样本实验及长期随访证实)。

研究仍存在局限性。样本量较少; 病毒性肝炎肝硬化实验样本纳入时, 并未完全排除有饮酒史的样本。诊断肝硬化标准并未采用肝活检这一有创检查, 在选择样本纳入时, 可能存在选择偏移。由于缺乏肝活检资料, 实验评估PNPLA3 I148M与肝损伤相关性时采用检测ALT、AST、TBIL、ALB、Child-Pugh分级等指标, 评价损伤程度不够直观。但就我们所知, 本研究是目前第一篇探究PNPLA3 I148M与中国汉族肝硬化病因学相关性的研究。

是否可将PNPLA3 I148M纳入常规基因筛查, 协助肝硬化治疗及评估预后, 是否可考虑加用他汀类药物或减轻体重以协助预防原发性肝癌发展, 还有待大样本实验证实。总之, 研究认为PNPLA3 I148M rs738409 C>G与中国汉族酒精性肝硬化易感性相关, 同时与乙型肝炎肝硬化易感性可能相关。

4 参考文献

- 1 于建国. 关注肝纤维化与肝硬化的防治研究. 中华医学会第十四次全国病毒性肝炎及肝病学术会议论文集, 2009: 232-235
- 2 Wilson PA, Gardner SD, Lambie NM, Commans SA, Crowther DJ. Characterization of the human patatin-like phospholipase family. *J Lipid Res* 2006; 47: 1940-1949 [PMID: 16799181 DOI: 10.1194/jlr.M600185-JLR200]
- 3 Huang Y, He S, Li JZ, Seo YK, Osborne TF, Cohen JC, Hobbs HH. A feed-forward loop amplifies nutritional regulation of PNPLA3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 7892-7897 [PMID: 20385813 DOI: 10.1073/pnas.1003585107]
- 4 Browning JD, Cohen JC, Hobbs HH. Patatin-like phospholipase domain-containing 3 and the pathogenesis and progression of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010; 52: 1189-1192 [PMID: 20879029 DOI: 10.1002/hep.23946]
- 5 Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet* 2008; 40: 1461-1465 [PMID: 18820647 DOI: 10.1038/ng.257]
- 6 Valenti L, Rumi M, Galmozzi E, Aghemo A, Del Menico B, De Nicola S, Dongiovanni P, Maggioni M, Fracanzani AL, Rametta R, Colombo M, Fargion S. Patatin-like phospholipase domain-containing 3 I148M polymorphism, steatosis, and liver damage in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2011; 53: 791-799 [PMID: 21319195 DOI: 10.1002/hep.24123]
- 7 Falletti E, Fabris C, Cmet S, Cussigh A, Bitetto D, Fontanini E, Fornasiere E, Bignulin S, Fumolo E, Bignulin E, Pirisi M, Toniutto P. PNPLA3 rs738409C/G polymorphism in cirrhosis: relationship with the aetiology of liver disease and hepatocellular carcinoma occurrence. *Liver Int* 2011; 31: 1137-1143 [PMID: 21745286 DOI: 10.1111/j.1478-3231.2011.02534.x]
- 8 Burza MA, Molinaro A, Attilia ML, Rotondo C, Attilia F, Ceccanti M, Ferri F, Maldarelli F, Maffongelli A, De Santis A, Attali AF, Romeo S, Ginanni Corradini S. PNPLA3 I148M (rs738409) genetic variant and age at onset of at-risk alcohol consumption are independent risk factors for alcoholic cirrhosis. *Liver Int* 2014; 34: 514-520 [PMID: 24102786 DOI: 10.1111/liv.12310]
- 9 Way MA, McQuillin HMD, Gurling MY, Morgan, UCL Molecular Psychiatry, UCL Institute for Liver & Digestive Health. The PNPA3 I148M mutation significantly increases the risk of developing alcohol-related cirrhosis in alcohol dependent individuals. *J Hepatol* 2013; 58: S563 [DOI: 10.1016/S0168-8278(13)61403-8]
- 10 Stickel F, Buch S, Lau K, Meyer zu Schwabedissen H, Berg T, Ridinger M, Rietschel M, Schafmayer C, Braun F, Hinrichsen H, Günther R, Arlt A, Seeger M, Müller S, Seitz HK, Soyka M, Lerch M, Lammert F, Sarrazin C, Kubitz R, Häussinger D, Hellerbrand C, Bröring D, Schreiber S, Kiefer F, Spanagel R, Mann K, Datz C, Krawczak M, Wodarz N, Völzke H, Hampe J. Genetic variation in the PNPLA3 gene is associated with alcoholic liver injury in caucasians. *Hepatology* 2011; 53: 86-95 [PMID: 21254164 DOI: 10.1002/hep.24017]
- 11 Nischalke HD, Berger C, Luda C, Berg T, Müller T, Grünhage F, Lammert F, Coenen N, Krämer B, Körner C, Vidovic N, Oldenburg J, Nattermann J, Sauerbruch T, Spengler U. The PNPLA3 rs738409 148M/M genotype is a risk factor for liver cancer in alcoholic cirrhosis but shows no or weak association in hepatitis C cirrhosis. *PLoS One* 2011; 6: e27087 [PMID: 22087248 DOI: 10.1371/journal.pone.0027087]
- 12 Guyot E, Sutton A, Rufat P, Laguillier C, Mansouri A, Moreau R, Ganne-Carrié N, Beaugrand M, Charnaux N, Trinchet JC, Nahon P. PNPLA3 rs738409, hepatocellular carcinoma occurrence and risk model prediction in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2013; 58: 312-318 [PMID: 23069476 DOI: 10.1016/j.jhep.2012.09.036]
- 13 Tian C, Stokowski RP, Kershenovich D, Ballinger DG, Hinds DA. Variant in PNPLA3 is associated

- with alcoholic liver disease. *Nat Genet* 2010; 42: 21-23 [PMID: 19946271 DOI: 10.1038/ng.488]
- 14 Dutta AK. Genetic factors affecting susceptibility to alcoholic liver disease in an Indian population. *Ann Hepatol* 2013; 12: 901-907 [PMID: 24114820]
- 15 Corradini SG, Burza MA, Molinaro A, Romeo S. Patatin-like phospholipase domain containing 3 sequence variant and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2011; 53: 1776; author reply 1777 [PMID: 21351112]
- 16 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组. 酒精性肝病诊疗指南(2010年修订版). 中华肝脏病杂志 2010; 18: 167-170
- 17 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010年版). 肝脏 2011; 16: 2-16
- 18 中华医学会肝病学会, 中华医学会传染病与寄生虫病学分会. 丙型肝炎防治指南. 深圳国际消化病论坛, 2005
- 19 Baulande S, Lasnier F, Lucas M, Pairault J. Adiponutrin, a transmembrane protein corresponding to a novel dietary- and obesity-linked mRNA specifically expressed in the adipose lineage. *J Biol Chem* 2001; 276: 33336-33344 [PMID: 11431482 DOI: 10.1074/jbc.M105193200]
- 20 Jenkins CM, Mancuso DJ, Yan W, Sims HF, Gibson B, Gross RW. Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem* 2004; 279: 48968-48975 [PMID: 15364929 DOI: 10.1074/jbc.M407841200]
- 21 Trépo E, Gustot T, Degré D, Lemmers A, Verset L, Demetter P, Ouziel R, Quertinmont E, Vercruysse V, Amininejad L, Deltenre P, Le Moine O, Devière J, Franchimont D, Moreno C. Common polymorphism in the PNPLA3/adiponutrin gene confers higher risk of cirrhosis and liver damage in alcoholic liver disease. *J Hepatol* 2011; 55: 906-912 [PMID: 21334404 DOI: 10.1016/j.jhep.2011.01.028]
- 22 Trépo E, Pradat P, Potthoff A, Momozawa Y, Quertinmont E, Gustot T, Lemmers A, Berthillon P, Amininejad L, Chevallier M, Schlué J, Kreipe H, Devière J, Manns M, Trépo C, Sninsky J, Wedemeyer H, Franchimont D, Moreno C. Impact of patatin-like phospholipase-3 (rs738409 C > G) polymorphism on fibrosis progression and steatosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2011; 54: 60-69 [PMID: 21488075 DOI: 10.1002/hep.24350]
- 23 Chamorro AJ, Torres JL, Mirón-Canelo JA, González-Sarmiento R, Laso FJ, Marcos M. Systematic review with meta-analysis: the I148M variant of patatin-like phospholipase domain-containing 3 gene (PNPLA3) is significantly associated with alcoholic liver cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2014; 40: 571-581 [PMID: 25060292 DOI: 10.1111/apt.12890]
- 24 Nakamura M, Kanda T, Nakamoto S, Miyamura T, Jiang X, Wu S, Yokosuka O. No correlation between PNPLA3 rs738409 genotype and fatty liver and hepatic cirrhosis in Japanese patients with HCV. *PLoS One* 2013; 8: e81312 [PMID: 24349054 DOI: 10.1371/journal.pone.0081312]
- 25 Valenti L, Colombo M, Fargion S. Modulation of the effect of PNPLA3 I148M mutation on steatosis and liver damage by alcohol intake in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2011; 55: 1470-1471; author reply 1471-1472 [PMID: 22100032 DOI: 10.1016/j.jhep.2011.04.032]
- 26 Tong J, Guo J, Hu J, Hou S, Zhang Y, Li Q. Correlation between patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 gene polymorphisms and liver cirrhosis in a chinese han population with chronic hepatitis B. *Hepat Mon* 2014; 14: e18943 [PMID: 25337145 DOI: 10.5812/hepatmon.18943]
- 27 Brouwer WP, van der Meer AJ, Boonstra A, Pas SD, de Knecht RJ, de Man RA, Hansen BE, ten Kate FJ, Janssen HL. The impact of PNPLA3 (rs738409 C>G) polymorphisms on liver histology and long-term clinical outcome in chronic hepatitis B patients. *Liver Int* 2015; 35: 438-447 [PMID: 25284145]
- 28 姜曼, 辛永宁, 王卫滨, 林中华, 张丁丁, 李长严, 姜相君, 宣世英. 青岛地区汉族人群PNPLA3基因rs738409(C→G)多态性与慢性乙型肝炎的相关性. 中华肝脏病杂志 2014; 22: 340-343
- 29 Bondini S, Kallman J, Wheeler A, Prakash S, Gramlich T, Jondle DM, Younossi ZM. Impact of non-alcoholic fatty liver disease on chronic hepatitis B. *Liver Int* 2007; 27: 607-611 [PMID: 17498244 DOI: 10.1111/j.1478-3231.2007.01482.x]
- 30 Yun JW, Cho YK, Park JH, Kim HJ, Park DI, Sohn CI, Jeon WK, Kim BI, Son BH, Shin JH. Hepatic steatosis and fibrosis in young men with treatment-naïve chronic hepatitis B. *Liver Int* 2009; 29: 878-883 [PMID: 19192167 DOI: 10.1111/j.1478-3231.2009.01976.x]
- 31 Wong VW, Wong GL, Chu WC, Chim AM, Ong A, Yeung DK, Yiu KK, Chu SH, Chan HY, Woo J, Chan FK, Chan HL. Hepatitis B virus infection and fatty liver in the general population. *J Hepatol* 2012; 56: 533-540 [PMID: 22027575 DOI: 10.1016/j.jhep.2011.09.013]
- 32 Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* 2011; 332: 1519-1523 [PMID: 21700865 DOI: 10.1126/science.1204265]
- 33 Kawaguchi T, Sumida Y, Umemura A, Matsuo K, Takahashi M, Takamura T, Yasui K, Saibara T, Hashimoto E, Kawanaka M, Watanabe S, Kawata S, Imai Y, Kokubo M, Shima T, Park H, Tanaka H, Tajima K, Yamada R, Matsuda F. Genetic polymorphisms of the human PNPLA3 gene are strongly associated with severity of non-alcoholic fatty liver disease in Japanese. *PLoS One* 2012; 7: e38322 [PMID: 22719876 DOI: 10.1371/journal.pone.0038322]
- 34 Kowdley KV. Iron, hemochromatosis, and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127: S79-S86 [PMID: 15508107 DOI: 10.1016/j.gastro.2004.09.019]
- 35 Lambrecht RW, Sterling RK, Naishadham D, Stoddard AM, Rogers T, Morishima C, Morgan TR, Bonkovsky HL. Iron levels in hepatocytes and portal tract cells predict progression and outcomes of patients with advanced chronic

- hepatitis C. *Gastroenterology* 2011; 140: 1490-1500. e3 [PMID: 21335007]
- 36 Pirazzi C, Valenti L, Motta BM, Pingitore P, Hedfalk K, Mancina RM, Burza MA, Indiveri C, Ferro Y, Montalcini T, Maglio C, Dongiovanni P, Fargion S, Rametta R, Pujia A, Andersson L, Ghosal S, Levin M, Wiklund O, Iacovino M, Borén J, Romeo S. *PNPLA3* has retinyl-palmitate lipase activity in human hepatic stellate cells. *Hum Mol Genet* 2014; 23: 4077-4085 [PMID: 24670599 DOI: 10.1093/hmg/ddu121]
- 37 Newcomer ME, Ong DE. Plasma retinol binding protein: structure and function of the prototypic lipocalin. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1482: 57-64 [PMID: 11058747 DOI: 10.1016/S0167-4838(00)00150-3]
- 38 Erikstrup C, Mortensen OH, Nielsen AR, Fischer CP, Plomgaard P, Petersen AM, Krogh-Madsen R, Lindegaard B, Erhardt JG, Ullum H, Benn CS, Pedersen BK. RBP-to-retinol ratio, but not total RBP, is elevated in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2009; 11: 204-212 [PMID: 19215278]
- 39 Goodman DW, Huang HS, Shiratori T. Tissue distribution and metabolism of newly absorbed vitamin a in the rat. *J Lipid Res* 1965; 6: 390-396 [PMID: 14336210]
- 40 Blomhoff R, Rasmussen M, Nilsson A, Norum KR, Berg T, Blaner WS, Kato M, Mertz JR, Goodman DS, Eriksson U. Hepatic retinol metabolism. Distribution of retinoids, enzymes, and binding proteins in isolated rat liver cells. *J Biol Chem* 1985; 260: 13560-13565 [PMID: 2997171]
- 41 Fields AL, Soprano DR, Soprano KJ. Retinoids in biological control and cancer. *J Cell Biochem* 2007; 102: 886-898 [PMID: 17902161 DOI: 10.1002/jcb.21530]
- 42 Mongan NP, Gudas LJ. Diverse actions of retinoid receptors in cancer prevention and treatment. *Differentiation* 2007; 75: 853-870 [PMID: 17634071]
- 43 Freemantle SJ, Spinella MJ, Dmitrovsky E. Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance. *Oncogene* 2003; 22: 7305-7315 [PMID: 14576840 DOI: 10.1038/sj.onc.1206936]
- 44 Muto Y, Moriwaki H, Ninomiya M, Adachi S, Saito A, Takasaki KT, Tanaka T, Tsurumi K, Okuno M, Tomita E, Nakamura T, Kojima T. Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid, polyprenoic acid, in patients with hepatocellular carcinoma. Hepatoma Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1996; 334: 1561-1567 [PMID: 8628336 DOI: 10.1056/NEJM199606133342402]
- 45 Muto Y, Moriwaki H, Saito A. Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid in patients with hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 1999; 340: 1046-1047 [PMID: 10189289 DOI: 10.1056/NEJM199904013401315]
- 46 Siegel AB. An ounce of prevention is better than a pound of cure: a patient-centered approach to hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2013; 31: 1499-1501 [PMID: 23509320 DOI: 10.1200/JCO.2012.48.5367]

编辑: 郭鹏 电编: 都珍珍

