

# 间质金属蛋白酶基因多态性与中心性肥胖在非酒精性脂肪肝病中交互作用研究

吴鹏波 舒泳翔 李明 罗和生 张国 谭诗云

**【摘要】 目的** 探讨间质金属蛋白酶-9 (MMP-9)-1562C/T (rs3918242) 以及 MMP-2-1306C/T (rs243865) 位点单核苷酸多态性 (SNP) 与非酒精性脂肪肝 (NAFLD) 遗传易感性以及与中心性肥胖交互作用。**方法** 对 545 例 NAFLD 患者和 636 例正常对照, 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 分析 rs24386 以及 rs3918242 基因型、非条件 logistic 分析各基因型与脂肪肝发病易感性关系, 利用非条件 logistic 分析和广义多因子降维 (GMDR) 法分析 rs3918242、rs243865 与中心性肥胖的交互作用。**结果** MMP-9 rs3918242 位点 T 基因携带者 (TT/CT) 与非 T 基因携带者 (CC) 的 NAFLD 罹患风险明显增加 ( $OR=1.67, 95\% CI: 1.32 \sim 2.12, P=0.001$ ; 调整  $OR=1.65, 95\% CI: 1.31 \sim 2.01, P=0.008$ ); 而 MMP-2 rs243865 位点 T 基因携带者 (TT/CT) 与非 T 基因携带者 (CC) 的 NAFLD 罹患风险明显降低 ( $OR=0.68, 95\% CI: 0.53 \sim 0.86, P=0.001$ ; 调整  $OR=0.66, 95\% CI: 0.49 \sim 0.90, P=0.007$ )。广义多因子降维法分析结果显示, rs3918242 与中心性肥胖在 NAFLD 发病中存在交互作用 ( $P=0.001$ )。利用非条件 logistic 校正年龄、性别、腰围、BMI、LDL-C、HDL-C、FPG、胰岛素抵抗指数后, 分析显示, 携带 rs3918242 TT/CT 基因型中心性肥胖个体罹患 NAFLD 的风险高于携带 CC 基因非吸烟个体 ( $OR=4.50, 95\% CI: 2.78 \sim 7.17, P=0.007$ )。**结论** MMP-9 基因的 rs3918242 以及 MMP-2 基因的 rs243865 与 NAFLD 患病罹患风险紧密相关, rs3918242 与中心性肥胖在 NAFLD 发病中具有协同效应。

**【关键词】** 基质金属蛋白酶; 非酒精性脂肪肝病; 多态性; 中心性肥胖; 交互作用

## Study on the interaction between matrix metalloproteinases gene polymorphism and central obesity in nonalcoholic fatty liver disease

Wu Pengbo<sup>1</sup>, Shu Yongxiang<sup>1</sup>, Li Ming<sup>1</sup>, Luo Hesheng<sup>1</sup>, Zhang Guo<sup>2</sup>, Tan Shiyun<sup>1</sup>. 1 Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China; 2 Department of Gastroenterology, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region

Corresponding author: Tan Shiyun, Email: tanshiyun@medmail.com

This work was supported by a grant from the Hubei Provincial Natural Science Fund (No. 2012CDZ029).

**【Abstract】 Objective** To study whether matrix metalloproteinases-9 (MMP)-1562C/T (rs3918242) and MMP-2-1306C/T (rs243865) were associated with the susceptibility on nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and the interactions between the two factors and central obesity. **Methods** Genotypes of 545 patients and 636 subjects with NAFLD under control were examined by polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Unconditional logistic regression (ULR) was performed to assess the NAFLD risk. The gene-environment interactions on the risk of NAFLD were explored by generalized multifactor dimensionality reduction (GMDR) and ULR methods. **Results** Results from the case-control analysis indicated that there was an increased risk of developing NAFLD for MMP-9 rs3918242 (TT/CT) genotype carriers, when compared with the non-carriers (CC), with  $OR=1.67, 95\% CI: 1.32-2.12, P=0.001$ ; Adjusted  $OR=1.65, 95\% CI: 1.31-2.01 (P=0.008)$ . However, risk reduction of NAFLD was found when MMP-2 rs243865 (TT/CT) genotype carriers compared with the non-carriers (CC), with  $OR=0.68, 95\% CI: 0.53-0.86, P=0.001$ ; with adjusted  $OR=0.66, 95\% CI: 0.49-0.90 (P=0.007)$ . Data from the GMDR showed that gene-environment interaction among rs3918242 and central obesity on the risk of NAFLD might be significant ( $P=0.001$ ). By using the

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2015.12.022

基金项目:湖北省自然科学基金项目(2012CDZ029)

作者单位:430060 武汉大学人民医院消化内科(吴鹏波、舒泳翔、李明、罗和生、谭诗云); 广西壮族自治区人民医院消化内科(张国)

通信作者:谭诗云, Email: tanshiyun@medmail.com

ULR method, subjects as central obesity-positive but with genotype CT/TT, appeared having 4.50 (95% CI: 2.78-7.17,  $P=0.007$ ) times risk of NAFLD, when compared to the central obesity-negative subjects with genotype CC after adjusting for the covariates. **Conclusion** MMP-9 rs3918242, MMP-2 rs243865 were associated with risk of NAFLD while both rs3918242 and central obesity showing synergistic effects on the risk of the NAFLD.

**【Key words】** Matrix metalloproteinases; Nonalcoholic fatty liver disease; Polymorphism; Central obesity; Interaction

非酒精性脂肪肝病(NAFLD)不仅可以进展成肝硬化甚至肝癌,同时也可以增加高血压、糖尿病等心血管以及代谢性疾病的罹患风险<sup>[1]</sup>。国内外研究表明,NAFLD有家族性发病的现象,提示遗传因素在其发病过程中起着重要作用<sup>[2]</sup>。基质金属蛋白酶(MMP)是人体中参与细胞外基质重塑、重建等病理生物过程的蛋白水解酶,与胰岛素抵抗及炎症反应相关<sup>[3-4]</sup>。研究显示,血清MMP-2和MMP-9在肥胖以及糖尿病患者中升高<sup>[5-6]</sup>。本研究通过采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)了解MMP-9-1562C/T(rs3918242)以及MMP-2-1306C/T(rs243865)与中心性肥胖在非酒精脂肪肝病中的交互作用。

### 对象与方法

1. 研究对象:选取2012年1月至2014年9月于武汉大学人民医院体检中心体检者,年龄范围20~70岁,所有患者常规行腹部彩超检查,根据彩超结果分为NAFLD组545例和对照组636例。诊断标准符合《非酒精性脂肪肝病诊疗指南(2010年修订)》。根据“中国高血压防治指南(2010)”将研究对象分中心性肥胖和非中心性肥胖组(男性腰围>90 cm,女性腰围>85 cm)。

#### 2. 研究方法:

(1)一般资料收集:通过询问及测量,收集受试者年龄、性别以及体重、腰围、身高等资料。

(2)生化指标检测:抽取受试者空腹静脉血,采用罗氏日立7600全自动生化分析仪测定所有受试者的血清TC、TG、HDL-C、LDL-C、FPG以及空腹胰岛素(FINS),计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR), $HOMA-IR=FPG \times FINS/22.5$ 。

(3)rs243865, rs3918242多态性检测:采取酚-氯仿法提取外周血基因组DNA。根据MMP-9以及MMP-2基因核苷酸序列设计引物:rs243865上游:5'-CTT CCT AGG CTG GTC CTT ACT GA-3',下游:5'-CTG AGA CCT GAA GAC CTA AAG AGC T-3'; rs3918242上游:5'-GCC TGGC ACA TAG TAG GCC C-3',下游:5'-CTT CCT AGC CAG

CCG GCA TC-3'。PCR反应体系(25  $\mu$ l):100 ng DNA, 1.0 U Taq酶[宝生物工程(大连)有限公司], 2  $\mu$ l上游、下游引物及2 $\times$ PCR buffer。PCR反应条件:94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 58  $^{\circ}$ C(rs243865)、65  $^{\circ}$ C(rs3918242) 45 s, 72  $^{\circ}$ C 45 s, 30个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。采用Xsp I(rs243865)、Pae I(rs3918242)进行酶切,酶切产物进行3%琼脂糖电泳;EB染色成像,以此判定基因型。

3. 统计学分析:采用SPSS 17.0软件进行分析。基因型和等位基因频率比较采用非条件logistic回归分析,基因型Hardy-Weinberg遗传平衡检验采用 $\chi^2$ 检验。计量资料符合正态分布则采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。对于不符合正态分布的资料采用M(最大值~最小值)表示,比较采用Mann-Whitney U检验;运用logistic分析rs243865和rs3918242在NAFLD中作用;广义多因子降维(GMDR)法分析rs243865和rs3918242与吸烟在NAFLD发病过程中的交互作用,通过非条件logistic以及Bootstrap方法估计两者间的相加交互作用<sup>[7]</sup>,计算相对超额危险度比(RERI)、归因比(API)和交互作用指数(S)及其95%CI。RERI和API值的95%CI包括0, S值的95%CI包括1,为不存在相加交互作用。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

### 结果

1. 一般情况:对照组与NAFLD组性别、年龄、TC、TG等差异无统计学意义,腰围、BMI、LDL-C、HDL-C、FPG、HOM-IR和中心性肥胖发生率间的差异有统计学意义(表1)。

2. SNP: MMP-2 rs243865 PCR产物经酶切后, TT基因型为162、26和5 bp 3个片段, TC基因型为188、162、26和5 bp 4个片段, CC基因型为188、5 bp 2个片段,由于26和5 bp分子质量较小,在电泳图中均不可见(图1A)。MMP-9 rs3918242 PCR产物经酶切后, TT基因型为247和188 bp的2个片段, TC基因型为247、188和435 bp的3个片段, CC基因型为1条435 bp的片段(图1B)。

3. rs3918242、rs243865与NAFLD易感性:

表1 一般临床资料

变量	NAFLD组(n=545)	对照组(n=636)	P值
性别(男/女)	301/244	324/312	0.141
年龄(岁, $\bar{x} \pm s$ )	45.6 ± 10.3	46.9 ± 13.3	0.064
BMI(kg/m <sup>2</sup> , $\bar{x} \pm s$ )	23.6 ± 4.3	22.9 ± 3.5	0.002
WC(cm, $\bar{x} \pm s$ )	86.9 ± 12.3	85.3 ± 12.2	0.020
TC(mmol/L, $\bar{x} \pm s$ )	3.6 ± 1.3	3.5 ± 1.9	0.225
TG(mmol/L, $\bar{x} \pm s$ )	1.8 ± 0.9	1.7 ± 0.9	0.057
LDL-C(mmol/L, $\bar{x} \pm s$ )	2.5 ± 0.6	2.4 ± 0.8	0.017
HDL-C(mmol/L, $\bar{x} \pm s$ )	1.7 ± 0.7	2.0 ± 0.9	0.000
FBG(mmol/L) <sup>a</sup>	4.8(3.3 ~ 8.7)	3.6(3.5 ~ 6.9)	0.039
HOM-IR( $\bar{x} \pm s$ )	3.1 ± 0.6	2.4 ± 0.8	0.000
中心性肥胖率(%)	46.05	36.79	0.001

注:<sup>a</sup>括号外数据为M,括号内数据为最大值~最小值

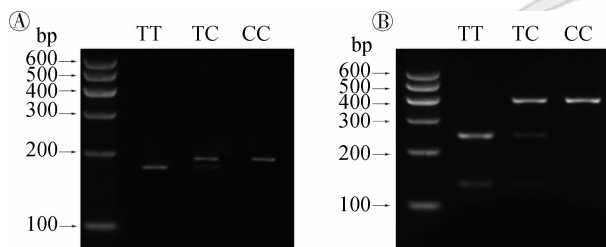


图1 MMP-2 rs243865(A)、MMP-9 rs3918242(B) PCR产物酶切电泳

rs3918242、rs243865在对照组和病例组中的分布均符合Hardy-Weinberg遗传平衡定律(rs3918242:  $\chi^2=2.00, P=0.156; \chi^2=0.62, P=0.433$ ; rs243865:  $\chi^2=0.14, P=0.710; \chi^2=1.20, P=0.273$ )。利用非条件logistic校正年龄、性别、腰围、BMI、LDL-C、HDL-C、血糖、HOMA-IR后MMP-9 rs3918242基因型CT的个体罹患NAFLD风险是基因型CC的1.69倍(95%CI: 1.24 ~ 2.11,  $P=0.010$ ); TT基因型个体罹患NAFLD风险是基因型CC的1.66倍(95%CI: 1.09 ~ 2.56,  $P=0.041$ ); T基因携带者(CC/CT)个体罹患NAFLD风险是非T基因携带者(CC)的1.65倍(95%CI: 1.31 ~ 2.01,  $P=0.008$ ); MMP-2 rs243865基因型CT的个体罹患NAFLD风险是基因型CC的0.59倍(95%CI: 0.59 ~ 0.91,  $P=0.021$ ); TT基因型个体罹患NAFLD风险是基因型CC的0.56倍(95%CI: 0.31 ~ 0.92,  $P=0.024$ ); T基因携带者(CC/CT)个体罹患NAFLD风险是非T基因携带者(CC)的0.66倍(95%CI: 0.49 ~ 0.90,  $P=0.007$ ),见表2。

4. rs243865、rs3918242多态性与中

心性肥胖交互作用:采用GMDR法分析MMP-2 rs243865、MMP-9 rs3918242与中心性肥胖间的高阶交互作用,结果显示,rs3918242中心性肥胖模型具有最高预测正确率(67.75%)和最高的交叉验证一致性(10/10),为最优模型,提示rs3918242与中心性肥胖二者之间可能存在交互作用。采用非条件logistic分析进一步验证这种交互作用,与携带rs3918242 TT基因不吸烟个体相比,携带CT/TT基因型无中心性肥胖个体罹患NAFLD风险增加( $OR=1.57, 95\%CI: 1.12 \sim 2.02, P=0.012$ ),携带CC基因型中心性肥胖个体罹患NAFLD风险增加( $OR=1.38, 95\%CI: 1.02 \sim 1.91, P=0.037$ ),携带CT/TT基因型中心性肥胖个体罹患NAFLD风险增加( $OR=4.50, 95\%CI: 2.78 \sim 7.17, P=0.007$ ),交互作用分析显示,两者存在相加交互作用( $RERI=2.55, 95\%CI: 1.36 \sim 3.74; API=0.57, 95\%CI: 0.29 \sim 0.85; S=3.68, 95\%CI: 1.70 \sim 7.01$ )。rs3918242与中心性肥胖二者之间可能存在相乘交互作用( $OR_{multi}^a=2.08, 95\%CI: 1.21 \sim 3.51, P=0.002$ )。见表3。

讨论

研究显示,遗传因素在NAFLD发病中发挥着重要作用<sup>[8-10]</sup>。从遗传易感性角度确定NAFLD高危人群,并进行针对性的预防是目前降低NAFLD发生

表2 rs243865、rs3918242与NAFLD易感性关系

基因型	基因分布		校正前		校正后	
	对照组	NAFLD组	OR值(95%CI)	P值	调整OR值(95%CI) <sup>a</sup>	P值
CC	417	290	1.00		1.00	
CT	189	220	1.67(1.31 ~ 2.14)	0.001	1.69(1.24 ~ 2.11)	0.010
TT	30	35	1.68(1.01 ~ 2.79)	0.045	1.66(1.09 ~ 2.56)	0.041
CT/TT	219	255	1.67(1.32 ~ 2.12)	0.001	1.65(1.31 ~ 2.01)	0.008
CC	361	360	1.00		1.00	
CT	234	161	0.69(0.54 ~ 0.88)	0.003	0.59(0.59 ~ 0.91)	0.021
TT	41	24	0.59(0.35 ~ 0.99)	0.045	0.57(0.32 ~ 0.98)	0.044
CT/TT	275	184	0.68(0.53 ~ 0.86)	0.001	0.66(0.49 ~ 0.90)	0.007

注:<sup>a</sup>调整年龄、性别、腰围、BMI、LDL-C、HDL-C、FPG、HOM-IR

表3 rs3918242与中心性肥胖二者相加以及相乘交互作用

基因型	肥胖	NAFLD组	对照	OR <sub>add</sub> 值(95%CI) <sup>a</sup>	P <sub>add</sub> 值 <sup>a</sup>	OR <sub>multi</sub> 值(95%CI) <sup>b</sup>	P <sub>multi</sub> 值 <sup>b</sup>
TT	否	122	215	1.00		2.08(1.21 ~ 3.51)	0.002
CT/CC		172	187	1.57(1.12 ~ 2.02)	0.012		
TT	是	168	202	1.38(1.02 ~ 1.91)	0.037	4.50(2.78 ~ 7.17)	0.007
CT/CC		83	32	4.50(2.78 ~ 7.17)	0.007		
RERI值				2.55(1.36 ~ 3.74)			
API值				0.57(0.29 ~ 0.85)			
S值				3.68(1.70 ~ 7.01)			

注:校正腰围、BMI、LDL-C、HDL-C、FPG、HOM-IR;<sup>a</sup>相加交互作用;<sup>b</sup>相乘交互作用

风险的有效措施。本研究通过病例-对照实验分析,提示 *MMP-9* rs3918242 位点 T 基因携带者(TT/CT)与非 T 基因携带者(CC)的NAFLD罹患风险明显增加;而 *MMP-2* rs243865 位点 T 基因携带者(TT/CT)与非 T 基因携带者(CC)的NAFLD罹患风险明显降低,为排除腰围、BMI、LDL-C、HDL-C、FPG、HOM-IR、中心性肥胖发生率等混杂因素对研究的影响,采用非条件 logistic 回归分析予以校正,校正上述因素后结果未见明显变化。

现已明确肥胖为NAFLD危险因素<sup>[11-12]</sup>,rs3918242及rs243865与肥胖存在一定关联<sup>[8-9]</sup>。NAFLD是一种由遗传与环境因素以及其相互作用所致的复杂疾病<sup>[8-10]</sup>。为探讨基因与肥胖在NAFLD交互作用。本研究将肥胖作为环境因素纳入研究,探讨rs3918242和rs243865与肥胖在NAFLD中的交互作用。BMI是衡量整体肥胖的最常用指标,但该指标受脂肪和肌肉质量的影响。腰围近年来成为衡量肥胖的指标。与BMI相比,腰围更容易反映内脏脂肪堆积,对心血管以及NAFLD等代谢性疾病预测更为准确<sup>[13]</sup>。按照相关诊断标准根据腰围将研究对象分为中心性肥胖和非中心性肥胖。本研究采用GMDR法分析表明rs3918242与中心性肥胖在NAFLD发病中存在交互作用,而rs243865与中心性肥胖无交互作用。为进一步确定这种交互作用,采用非条件 logistic 回归分析予以验证。结果也提示,rs243865与中心性肥胖存在相加交互作用和相乘交互作用。rs243865与中心性肥胖在NAFLD机制鲜见报道,可能与rs243865不仅可以增加NAFLD罹患风险同时也可以导致个体肥胖风险增加有关<sup>[10]</sup>。

本研究存在局限性。首先,脂肪肝诊断是依据B超影像学而非肝穿刺;与肝穿刺相比,影像学诊断目前存在一定误差<sup>[14]</sup>。因此,病例组和对照组难以绝对区分。其次,本研究仅仅将肥胖这一环境因素纳入,而忽略了其他环境因素的影响。最后,研究中样本量较小,需要进一步扩大样本量。

### 参 考 文 献

- [1] Hu W, Zhang MX, Tan JH. Relations between nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome [J]. Chin J Epidemiol, 2014, 35(9): 1062-1064. (in Chinese)  
胡卫, 张苗旋, 谭金海. 非酒精性脂肪性肝病与代谢综合征相关性研究[J]. 中华流行病学杂志, 2014, 35(9): 1062-1064.
- [2] Mehta R, Bircerdinc A, Younossi ZM. Host genetic variants in obesity-related nonalcoholic fatty liver disease [J]. Clin Liver Dis, 2014, 18(1): 249-267.
- [3] Richardson DK, Kashyap S, Bajaj M, et al. Lipid infusion

decreases the expression of nuclear encoded mitochondrial genes and increases the expression of extracellular matrix genes in human skeletal muscle [J]. J Biol Chem, 2005, 280(11): 10290-10297.

- [4] Nissinen L, Kahäri VM. Matrix metalloproteinases in inflammation [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1840(8): 2571-2580.
- [5] Derosa G, Ferrari I, D'Angelo A, et al. Matrix metalloproteinase-2 and -9 levels in obese patients [J]. Endothelium: J Endoth Cell Res, 2008, 15(4): 219-224.
- [6] Signorelli SS, Malaponte G, Libra M, et al. Plasma levels and zymographic activities of matrix metalloproteinases 2 and 9 in type II diabetics with peripheral arterial disease [J]. Vasc Med, 2005, 10(1): 1-6.
- [7] Chen Q, Tang X, Hu YH. Detecting interaction for quantitative trait by generalized multifactor dimensionality reduction [J]. Chin J Epidemiol, 2010, 31(8): 938-941. (in Chinese)  
陈卿, 唐迅, 胡永华. 应用广义多因子降维法分析数量性状的交互作用[J]. 中华流行病学杂志, 2010, 31(8): 938-941.
- [8] Belo VA, Luizon MR, Carneiro PC, et al. Effect of metabolic syndrome risk factors and *MMP-2* genetic variations on circulating *MMP-2* levels in childhood obesity [J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(3): 2697-2704.
- [9] Andrade VL, Fernandes KS, Bosco AA, et al. Functional polymorphism located in *MMP-9* gene promoter is strongly associated with obesity [J]. DNA Cell Biol, 2012, 31(6): 1054-1057.
- [10] Singh K, Agrawal NK, Gupta SK, et al. A functional single nucleotide polymorphism-1562C/T in the matrix metalloproteinase-9 promoter is associated with type 2 diabetes and diabetic foot ulcers [J]. Int J Low Extrem Wounds, 2013, 12(3): 199-204.
- [11] Yan YK, Hou DQ, Duan JL, et al. Trends on the prevalence rates of obesity and cardiometabolic among children and adolescents in Beijing, during 2004-2013 [J]. Chin J Epidemiol, 2014, 35(4): 370-375. (in Chinese)  
闫坤坤, 侯冬青, 段佳丽, 等. 2004-2013年北京市学龄儿童肥胖及相关代谢异常的流行趋势[J]. 中华流行病学杂志, 2014, 35(4): 370-375.
- [12] Zhou X, Hou DQ, Duan JL, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and metabolic abnormalities in 387 obese children and adolescents in Beijing, China [J]. Chin J Epidemiol, 2013, 34(5): 446-450. (in Chinese)  
周歆, 侯冬青, 段佳丽, 等. 北京市387名肥胖中学生非酒精性脂肪肝等代谢异常罹患状况调查[J]. 中华流行病学杂志, 2013, 34(5): 446-450.
- [13] Schneider HJ, Friedrich N, Klotsche J, et al. The predictive value of different measures of obesity for incident cardiovascular events and mortality [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2010, 95(4): 1777-1785.
- [14] Wieckowska A, Feldstein AE. Diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease: invasive versus noninvasive [J]. Semin Liver Dis, 2008, 28(4): 386-395.

(收稿日期: 2015-04-30)

(本文编辑: 万玉立)