

· 论著 ·

## 2型糖尿病合并非酒精性脂肪肝中医体质分布规律与基因多态性关系研究

翁思颖<sup>1</sup>, 柴可夫<sup>2</sup>, 周建扬<sup>1</sup>( <sup>1</sup>浙江中医药大学附属宁波中医院, 宁波 315010; <sup>2</sup>浙江中医药大学, 杭州 310053 )

**摘要:** 目的: 探讨2型糖尿病(T2DM)合并非酒精性脂肪肝(NAFLD)患者中医体质分布规律及其与脂联素基因(apM1)多态性的关系。方法: 在184例宁波地区汉族人群(T2DM合并NAFLD 95例, 健康人群89名)中, 采用PCR技术研究脂联素45位点的单核苷酸多态性(SNP), 并运用体质九分法进行中医体质分型, 描述其分布频数比, 并用逻辑回归法分析中医体质与基因多态性的关系。结果: 宁波地区汉族人群T2DM合并NAFLD患者中, apM1+45有T/G的SNP存在, 其等位基因分布与健康人群有显著差异( $P<0.05$ ), 突变型(T/G、G/G)人群该病易感性增加( $OR=1.947$ ,  $95\%CI[1.082, 3.503]$ )。NAFLD组人群中气虚质(46.3%)、痰湿质(32.6%)分布增多, 与健康人群比较有显著差异( $P<0.05$ ), 且气虚、痰湿质分布与突变型(T/G、G/G)的出现呈正相关。结论: 脂联素基因+45位点T/G、G/G基因突变型人群T2DM合并NAFLD的易感性增加, 随着突变型(T/G、G/G)分布增多, 气虚、痰湿体质出现亦增多。

**关键词:** 非酒精性脂肪肝; 2型糖尿病; 基因多态性; 中医体质

**基金资助:** 浙江省科技计划项目(No.2015C33169), 浙江省中医药科技计划项目(No.2013ZB111), 宁波市中医重点学科中西医结合内分泌科(No.甬卫发[2016]55号)

### Correlation study on TCM constitution rules and gene polymorphism of type 2 diabetes mellitus complicating non-alcoholic fatty liver disease

WENG Si-ying<sup>1</sup>, CHAI Ke-fu<sup>2</sup>, ZHOU Jian-yang<sup>1</sup>( <sup>1</sup>Ningbo Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Ningbo 315010, China; <sup>2</sup>Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China )

**Abstract:** Objective: To investigate the correlation between TCM constitution rules and gene polymorphism of type 2 diabetes mellitus (T2DM) complicating non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Methods: PCR was performed to identify the single nucleotide polymorphisms (SNP) at the adiponectin locus +45 among 184 Chinese Han people in Ningbo area, including 95 patients with T2DM complicating NAFLD and 89 healthy volunteers. The subjects' TCM constitution were identified with Constitution Nine Point and their distribution frequency ratio were then described. The correlation between TCM constitution rules and gene polymorphism was analyzed with logistic regression. Results: SNP was found in T/G at apM1+45, and its allele distribution was different from that in control group ( $P<0.05$ ) in Chinese Han people of Ningbo region. Compared with the subject with T/T in SNP45, the patients with T/G and G/G at SNP45 had higher susceptibility to T2DM complicating NAFLD ( $OR=1.947$ ,  $95\%CI[1.082, 3.503]$ ). In the experimental group, qi deficiency constitution and phlegm dampness constitution respectively accounted for 45.26% and 29.47%, which were significantly higher than those in the control group ( $P<0.05$ ). The distribution of both constitution was positively correlated with the appearance of T/G and G/G at SNP45. Conclusion: People with T/G and G/G at apM1+45 have higher susceptibility to T2DM complicating NAFLD. With the increasing of mutant (T/G and G/G), patients with qi-deficiency and phlegm-dampness quality increased.

**Key words:** Non-alcoholic fatty liver disease; Type 2 diabetes mellitus; Gene polymorphism; TCM constitution

**Funding:** Science and Technology Project of Zhejiang Province (No.2015C33169), Science and Technology Program of Traditional Chinese Medicine of Zhejiang Province (No.2013ZB111), Key Medical Subjects Program of Ningbo Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Endocrinology Department (No.[2016]55)

通讯作者: 柴可夫, 浙江省杭州市滨江区滨文路548号浙江中医药大学基础医学院, 邮编: 310053, 电话: 0571-86613551

E-mail: ckf666@163.com

非酒精性脂肪肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一种发生、发展与遗传相关的疾病,易感性与多种基因相关。NAFLD常合并代谢综合征(metabolicsyndrome, MS)的各组分如肥胖、高脂血症、高尿酸血症等发病,其发病被认为与胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)密切相关。在脂肪细胞因子中,脂联素(adiponectin, APN)与IR程度呈负相关,且经研究发现<sup>[1]</sup>其基因单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)与2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)、肥胖等发病关系密切,其中45位点SNP(T/T、T/G、G/G型)被研究较多,但与IR、T2DM、NAFLD之间的关系,结果却并不统一。

中医体质学理论是现代中医辨证体系中的重要部分,研究发现,根据体质的不同,个体的基因表达、频率有特征性差异<sup>[2]</sup>。故为研究中医体质与基因表达的相关性,笔者运用中医体质九分法,分析探讨宁波地区汉族人群中T2DM合并NAFLD患者的中医体质分布规律、脂联素45位点SNP分布规律及两者之间的关系。

### 资料与方法

1. 研究对象 选取2014年1月–2015年12月于宁波市中医院就诊T2DM合并NAFLD患者,均为宁波地区汉族人,相互间无直接血缘关系。T2DM诊断符合1999年世界卫生组织(World Health Organization, WHO),制订的T2DM标准,排除各急性并发症及应激状态、严重的糖尿病慢性并发症等兼症。NAFLD诊断参照2012年中华肝脏病学学会制定《非酒精性脂肪肝诊断标准》<sup>[3]</sup>,肝CT值 $\leq 40$ HU或CT肝/脾比值 $\leq 1$ 者即可诊断,排除病毒性、自身免疫性、药物性肝炎及其他可导致脂肪肝的情况,排除大量饮酒因素(每周饮用乙醇中–大量:男性 $>140$ g/周,女性 $>70$ g/周)。同时满足以上条件者入选NAFLD组,共95例(男53例,女42例),年龄 $(51.03 \pm 14.97)$ 岁。选取同时期宁波市中医院体检中心健康人群89名为对照组(男41名,女48名),年龄 $(51.20 \pm 81.97)$ 岁。两组间性别、年龄比较,差异均无统计学意义。

2. 中医体质分类方法 参照《中医九种基本体质分类量表》<sup>[2]</sup>进行体质分类判定,将受试者体质分为气虚、阳虚、阴虚、痰湿、湿热、气郁、血瘀、特禀及平和质。量表中各条目按5段计分法,计算原始分转化分,将受试者答案输入北京炎黄东方健康科技公司提供的“炎黄中医体质辨识软件”,统一计分、判定体质类型。

3. 影像学资料采集 行上腹部CT平扫,测肝、脾CT值,计算肝/脾比值。

4. DNA提取及脂联素+45T/G(rs2241766)基因型检测 采血1mL,采用DNA提取试剂盒(天根生化科技,DP332)抽提入组人群外周血DNA。PCR技术扩增,根据文献<sup>[4]</sup>设计引物,上游5'-AGC AGC TCC TAG AAG TAG ACT C-3',下游5'-CTA CAC TCA TCC TTG GAA GAC C-3',预期扩增产物500bp(KOD FX

试剂,ToYoBo公司)。PCR反应条件:94℃预变性2min,98℃变性10s,57℃退火30s,68℃延伸30s,共40个循环。PCR产物经酶纯化及测序反应后进行测序,测序结果输入SeqMan软件进行SNP分析。

5. 统计学方法 数据用SPSS 22.0软件进行分析。等位基因的频率采用直接计数法,计数资料比较采用卡方检验;采用二元Logistic回归分析法计算基因多态性与体质类型之间关联;运用Hardy-Weinberg平衡检验确认样本的基因分型群体代表性, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

### 结果

1. 两组中医体质类型分布情况 NAFLD组中,气虚质、痰湿质的分布显著高于对照组( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),详见图1。

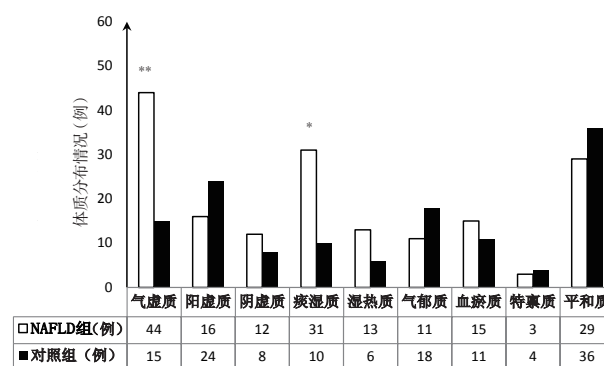


图1 两组中医体质类型构成比较

注:与对照组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ 。

在NAFLD组中共出现兼夹体质(即个体同时出现2种及以上体质分布)58例(61.05%),多于对照组出现兼夹体质的41例(46.07%),且NAFLD组出现了3例(3.2%)4种体质兼夹、15例(15.8%)3种体质兼夹,均高于对照组的0例(0%)和5例(5.6%)。详见图2。

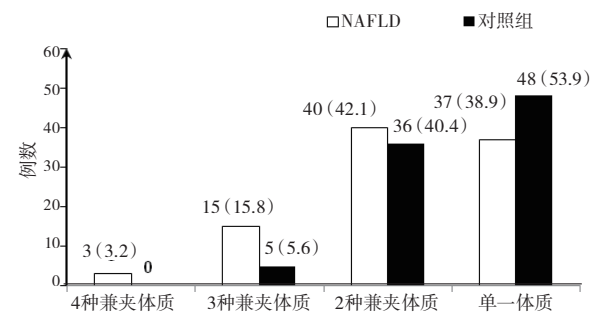


图2 两组中医兼夹体质分布情况[例(%)]

2. 基因型与等位基因频率比较对apM1+45位点的基因测序结果 见图3。入选的两组人群脂联素基因SNP+45存在基因多态性。其中NAFLD组T/T型(野生型)42例,T/G型突变杂合子44例,G/G型突变纯合子9例。对照组T/T型54例,T/G型杂合子32例,G/G型纯合子3例。两组的测序结果分别行Hardy-

表2 +45位点突变G基因型与中医体质的二元Logistic回归分析

自变量	B	标准误	Wald	df	P值	Exp (B)	95%CI
气虚质	1.739	0.382	20.733	1	0.000	5.692	[2.693,12.032]
痰湿质	1.278	0.411	9.663	1	0.002	3.589	[1.604,8.035]
常量	-0.693	0.207	11.222	1	0.001		

Weinberg平衡检验,结果显示样本均来自遗传平衡的总体,具有群体代表性。

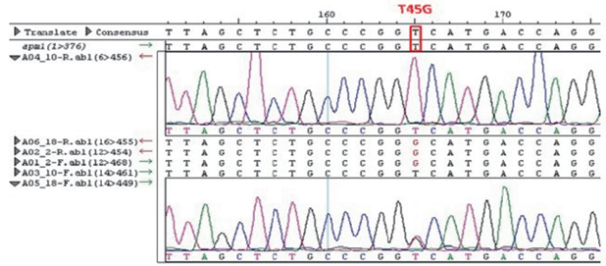


图3 +45T/G (RS2241766) 位点测序结果

由于G/G型纯合子含量较少,现将T/G型杂合子与其合并为1组进行计算。NAFLD组突变型(T/G+G/G)及等位基因型G分布均明显高于对照组( $P<0.05$ )。基因型为突变型(T/G+G/G)的人群T2DM合并NAFLD易感性增加( $OR=1.947$ ),携带突变等位基因G者T2DM合并NAFLD易感性增加( $OR=2.119$ )。详见表1。

表1 各组脂联素基因型、等位基因的分布频率[例(%)]

组别	例数	基因型		等位基因	
		TT	TG+GG	T	G
NAFLD组	95	42 (44.2)	53 (55.8)	128 (67.4)	62 (32.6)
对照组	89	54 (60.7)	35 (39.3)	140 (78.7)	38 (21.3)
$\chi^2/P$ 值		4.991/0.25		9.240/0.02	
OR值(95%CI)		1.947[1.082,3.503]		2.119[1.299,3.457]	

3. 脂联素SNP+45位点突变基因型T/G+G/G与中医体质的二元Logistic回归分析 将NAFLD组人群按突变型(T/G+G/G)与野生型(T/T)分为两组,作为因变量,将NAFLD组中出现的高频体质:气虚质、痰湿质作为自变量,进行二元Logistic回归分析,结果气虚质( $P<0.01$ )与痰湿质( $P<0.05$ )均进入回归方程,根据Exp(B)>1, B值为正数,判断气虚质、痰湿质与脂联素SNP+45位点突变型(T/G+G/G)的出现呈正相关。详见表2。

讨论

1. 运用中医辨证系统理论探讨T2DM合并NAFLD的中医体质分布特点 辨证是中医学理论精髓所在,但传统辨证方法缺少规范分型、亦未建立系统计算模型,导致结果易受调查者主观因素影响,且证候的不稳定、易受外界因素干扰亦影响研究结果。故本研究运用相对科学、严谨的中医体质学方法分析疾病

的发病机制。中医体质学是以传统辨证理论为基础,对“机体-心理-环境”的复杂整体系统,从功能状态角度揭示疾病在人体内发生、发展和调节控制规律并建立系统模型。体质分9种基本型,2种及以上体质共存称兼夹体质<sup>[5]</sup>。通过形成体质兼夹复合型,中医体质学可拓展到中医辨证体系的更大范围,是现代中医辨证论治体系的重要部分<sup>[6]</sup>。

2. 中医体质学理论与基因多态性的关系研究 现阶段关于中医体质的研究大多集中在9种体质横断面研究的宏观层面,关于体质微观基础的研究相对较少。宏观表象的背后必有微观生物学基础,而系统生物学方法则是目前最常用的研究微观层面的生物学基础、建立微量量化标准的方法,将其引入中医学研究,体质是一个很好的结合点<sup>[7]</sup>。基因组学是常用的系统生物学方法之一,随着当前“精准医学”理念的提出,“基于基因测序的靶向治疗”与其他机体系统生物学研究如代谢组学、微生物组学、环境因素等作为精准医学的研究方向成为关注的焦点,而中医体质学理论则与其相结合,通过9种体质辨识与调护,从全方位、系统化、整体化来实现中医理论体系下的“精准医学”<sup>[8]</sup>。

3. T2DM合并NAFLD的易感体质、易感基因及两者的相关性研究结果分析 本研究对T2DM合并NAFLD人群的中医体质分布规律进行了分析,发现其中气虚质(46.3%)与痰湿质(32.6%)出现较多,较健康人群差异有统计学意义( $P<0.05$ ),推断这两者为该疾病人群的高频体质。目前尚未发现同类体质研究结果的报道,类似的证候研究已有开展,但结果却并不统一。有研究针对NAFLD证候进行调查,发现肝郁脾虚证为该病最常见证型<sup>[9]</sup>。亦有对180例T2DM合并NAFLD人群开展的证素研究,结果显示痰湿是该病主要病机<sup>[10]</sup>。

中医学对糖尿病属“消渴”认识已久,脂肪肝亦可从《黄帝内经》对“肥气”的论述中找到描述。《素问·经脉别论》云:“食气入胃,浊气归心,淫精于脉。脉气流经,经气归于肺,肺朝百脉,输精于皮毛”。浊气者谷气也,谷气运化需脾气散精,饮食过甚则伤脾,故可认为气虚不运、痰浊中阻是本病的重要病机。这与气虚质、痰湿质为T2DM合并NAFLD高发体质的研究结果相一致,无论先天禀赋不足而气虚,还是后天多食伤脾导致中气耗损,皆可影响体质的形成。《素问·通评虚实论》亦云:“凡治消瘴,仆击,偏枯,痿厥,气满发逆,甘肥贵人,则膏粱之疾也”,可见消渴发病与长期进食肥甘厚味有关,肥胖者多发,阐述了长期生活方式对本病发病的影响,体现了中医体质可由后天因素影响



而改变的特征,亦说明了肥胖是本病的易感因素。清代黄元御在《素灵微蕴·消渴》载:“消渴之病则独责肝木,而不责肺金”,表明了消渴与肝病的相关性,而现代横断面研究亦证实T2DM患者群中脂肪肝的患病率高达46%<sup>[11]</sup>。

对兼夹体质的统计结果发现,实验组患病人群的兼夹体质(61.05%)要多于健康人群(46.07%),且同时拥有3种或以上体质的多重兼夹体质人群,实验组(20.0%)多于健康人群(5.6%),提示了患病人群较健康人群有着更复杂的体质分布,这可能是由于先天而得多种体质错杂而易感疾病,或者由于后天生活习惯、情志、疾病等因素长期影响而改变体质有关。

在对apM1+45位点基因多态性分布规律研究中,笔者发现宁波地区汉族人群T2DM合并NAFLD人群该位点等位基因分布与健康人群有差异,突变型(T/G、G/G)人群T2DM合并NAFLD易感性增加,故推断突变型人群为该病易感人群。此结果与国内1项相关研究的Meta分析结果类似<sup>[12]</sup>。现有的研究中亦有部分研究结果与本研究不一致。2012年1项印度的研究<sup>[12]</sup>发现脂联素+45位点野生型T/T较突变型(T/G、G/G)更有T2DM的易感倾向。2013年1项对患NAFLD的新疆地区汉族人群研究<sup>[14]</sup>发现,脂联素SNP+45T/G的基因多态性与NAFLD发病无相关性。调查对象的人种、区域差异可能是造成结果不一致的原因,而诊断NAFLD的方法差异与样本量尚不足也是造成不一致的因素之一。

对等位基因与体质分布的进一步逻辑回归分析显示,实验组人群气虚质、痰湿质的出现均与apM1+45突变型(T/G+G/G)分布呈正相关,表明在T2DM合并NAFLD人群中,拥有apM1+45突变型T/G或G/G者,较野生型T/T者更多地出现气虚质、痰湿质的分布。疾病的发生发展主要取决于正气的强弱盛衰,而体质反映了正气强弱盛衰的偏倾。体质是先天禀赋和后天因素共同作用的结果,故笔者推测在基因多态性可能与中医体质的先天形成与后天的变化及变化趋势相关联。从先天而言,由于禀受父母生殖之精、遗传基因的不同,就不同个体而言会形成不同的体质;从后天而言,由于饮食差异、生活起居的不同,在某一疾病的形成过程中,中医偏颇体质与该病的形成也具有一定的相关性。

本研究以T2DM合并NAFLD患者中医体质分布规律与脂联素基因多态性的相关性为切入点,发现了气虚质、痰湿质为其易感体质,脂联素基因+45位点突变型G等位基因的为易感基因,且该基因出现与气虚质、痰湿质分布正相关,为我们进一步了解

气虚体质的相关基因组学特征提供了线索,从体质论治T2DM合并NAFLD,体现了中医学辨证论治的思想,对于运用中医药防治糖尿病及其并发症提供一定的方向。

## 参 考 文 献

- [1] Tokushige K, Hashimoto E. Influence of adiponectin gene polymorphisms in Japanese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol*, 2009, 44(9): 976–982
- [2] 王琦. 中国人九种体质的发现. 北京: 科学出版社, 2011: 1, 65–67, 25–27
- [3] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学会. 中国非酒精性脂肪性肝病诊疗指南. *中国医学前沿杂志*, 2012, 4(7): 4–10
- [4] 王淑芳, 赵家军, 姜强, 等. 脂联素基因多态性与2型糖尿病相关性研究. *中华内分泌代谢杂志*, 2007, 23(1): 51–52
- [5] 朱燕波. 中医体质分类判定与兼夹体质的综合评价. *中华中医药杂志*, 2012, 27(1): 37
- [6] 袁冰. 试论中医体质学的发展趋势及其历史地位. *中华中医药杂志*, 2013, 28(1): 9–11
- [7] 王济, 李英帅, 李玲, 等. 9种中医体质类型的基因组学研究. *中华中医药杂志*, 2014, 29(12): 3871–3873
- [8] 王琦. 中国式的精准医学: 九体医学健康计划. *中华中医药杂志*, 2015, 30(10): 3407–3411
- [9] 郁强, 张声生, 周滔, 等. 调肝理脾方治疗非酒精性脂肪性肝病肝郁脾虚证的随机对照研究. *中国中西医结合杂志*, 2015, 35(4): 401–405
- [10] 陈筑红, 夏城东, 黄佳娜, 等. 2型糖尿病并发非酒精性脂肪肝病证素分析. *中国中西医结合杂志*, 2010, 30(5): 454–457
- [11] 高伟, 任瑞珍, 唐与晓, 等. 2型糖尿病脂肪肝的筛查及相关因素分析. *中华糖尿病杂志*, 2005, 13(2): 105–107
- [12] 李黎, 刘中华, 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. *中国循证医学*, 2012, 12(10): 1235–1240
- [13] Biswas Devadrita, Vetrivel V, Choudhury Jnankumar, et al. Adiponectin gene polymorphism and its association with T2DM mellitus. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 2011, 26(2): 172–177
- [14] 龚丽青, 李莉. 非酒精性脂肪肝脂联素SNP+45、SNP+276与脂联素水平以及相关指标的相关关系. *新疆医科大学学报*, 2013, 36(6): 860–868

(收稿日期: 2016年11月28日)