مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۳، شماره ۳، پاییز ۹۲، صفحات ۱۸۵ تا ۱۸۹

Original Article

همبستگی پلی‌مورفیسم D19H ژن ABCG8 با خطر تشکیل سنگ کیسه صفرا

سامان میلانی زاده[۱]، امیرهوشنگ محمد علیزاده[۲]، پدرام عظیم زاده[۱]، سارا رومانی[۳]، محمد روشنی[۴]، مهسا خوان یغما[۵]، سید رضا محبی[۶]، محمد رضا زالی[۲]

[۱] کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۲] استاد، فوق تخصص گوارش، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه شهید بهشتی
[۳] کارشناس ارشد ویروس شناسی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۴] فوق تخصص گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی کردستان
[۵] کارشناس ارشد زیست شناسی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
[۶] دکترای ویروس شناسی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: *در افراد مبتلا کلسترول بالا، صفرا بیش از اندازه افزایش یافته و باعث اشباع شدن صفرا و تشکیل سنگ می‌شود. محصول ژن ABCG8 در انتقال کلسترول به خارج از سلول عمل می‌کند و کلسترول محلول در صفرا را به وجود می‌آورد و به نظر می‌رسد تغییرات ژنتیکی در توالی این ناحیه باعث تغییر در عملکرد ژن و تشکیل سنگ کیسه صفرا شود. در این مطالعه، همبستگی پلی‌مورفیسم D19H ژن ABCG8 با خطر تشکیل سنگ کیسه صفرا بررسی شد.*

روش بررسی: *مطالعه به صورت مورد- شاهدی بر روی ۱۰۰ بیمار مبتلا به سنگ کیسه صفرا و ۱۰۶ فرد سالم فاقد سابقه خانوادگی این بیماری انجام شد. برای استخراج DNA از روش استخراج نمکی استفاده شد و برای شناسایی الل ها در ناحیه پلی مورف از واکنش PCR-RFLP استفاده شد.*

یافته‌ها: *ژنوتیپ هتروزیگوت (G/C) در این ناحیه پلی مورف با احتمال ابتلا به سنگ کیسه صفرا رابطه مستقیم داشت (نسبت شانس: ۷/۱۴؛ فاصله اطمینان ۹۵٪: ۱۴/۶۶-۳/۴۷؛ $p<0/001$) و افراد هتروزیگوت با احتمال نزدیک به ۷ برابر بیشتر به این بیماری مبتلا می‌شدند.*

نتیجه‌گیری: *این مطالعه نتایج پیشین در مورد پلی مورفیسم D19H بر روی ژن ABCG8 را تایید کرده و بیانگر اهمیت بالای این چند شکلی در جوامع مختلف می‌باشد. بدین سبب می‌توان از بررسی این ناحیه، با احتمال بالایی، به منظور عامل پیش گویی کننده استفاده کرد.*

واژگان کلیدی: *سنگ کیسه صفرا، ABCG8، پلی مورفیسم D19H.*

مقدمه

صفرا مایعی است متشکل از آب، کلسترول، نمک‌های صفراوی، برخی انواع پروتئین‌ها و بیلی روبین است که در کبد ساخته شده و تا زمان نیاز بدن به هضم چربی‌ها در کیسه صفرا ذخیره و تغلیظ می‌گردد.در برخی موارد اجزای مختلف صفرا به صورت اجسامی بلوری شکل در آمده و سنگ‌های کیسه صفرا را شکل می‌دهند. سنگ کیسه صفرا یکی از شایع‌ترین بیماری‌ها در جوامع مختلف می‌باشد که بار درمانی زیادی ایجاد می‌نماید. شیوع این بیماری در جوامع اروپایی ۲۰ درصد و در سیاه پوستان آمریکایی بیش از ۵۰ درصد است (۴-۱). چربی کلسترول در آب غیرمحلول، ولی در صفرا به صورت محلول می‌باشد. در بسیاری از افراد سطح کلسترول در صفرا بالاتر از حد معمول بوده و صفرا کاملا از کلسترول اشباع می گردد که در برخی موارد بلورهای کلسترول تشکیل شده و رسوب تدریجی این بلورها باعث تشکیل سنگ می‌شود. در حال حاضر مکانیسم ایجاد سنگ کیسه صفرا تقریبا شناخته

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، دکتر سید رضا محبی (**email**: srmohebbi@gmail.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۴/۷
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۸/۲۴

شده، اما دانش کافی در مورد ژن‌هایی که احتمال ابتلا به این بیماری را افزایش می دهند، هنوز تکمیل نگردیده است (۵). انسداد مجرای کیسه صفرا با سنگ علت زمینه‌ای بروز علائم بالینی سنگ‌های صفراوی می‌باشد. در مطالعات متعددی در زمینه بررسی نحوه شیوع، مشخص شده که علاوه بر عوامل محیطی، عوامل ژنتیکی هم در ابتلا به سنگ کیسه صفرا مؤثر می‌باشند (۸-۶). گروهی از پروتئین‌های عرض غشایی به نام کاست متصل شونده به ATP وجود دارند (ABC) که در انتقال مواد متنوعی نقش دارند. این خانواده دارای چهار تا هشت مارپیچ عرض غشایی می‌باشد که تفاوت در تعداد این مارپیچ‌ها و توالی آنها باعث تنوع این ناقلین می‌شوند (۹). یکی از مهم‌ترین اعضای این خانواده ABCG8 است که برای تشکیل پروتئین ناقل عملکردی با ABCG5 تشکیل هترودایمر می‌دهد. این دایمر پروتئینی در انتقال کلسترول به خارج از سلول عمل می‌کند و کلسترول محلول در صفرا را به وجود می‌آورد (۱۰، ۱۱). ژن‌های ABCG8 و ABCG5 در کنار هم بر روی کروموزوم ۲ قرار داشته و به وسیله فاکتورهای تنظیمی یکسانی تنظیم می‌شوند که منجر به بیان در سلول‌های یکسان و به روش مشابه می‌شود (۱۲). مطالعات محدودی بر روی پلی مورفیسم‌های ژن ABCG8انجام گردیده و پلی‌مورفیسم D19H در این ژن به عنوان یکی از چند شکلی‌های تاثیر گزار بر احتمال ابتلا به سنگ کیسه صفرا در جمعیت‌های مختلف گزارش شده است (۱۵-۱۲). مطالعه حاضر با هدف بررسی ارتباط پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی D19H با خطر تشکیل سنگ کیسه صفرا در بیماران ایرانی مراجعه کننده به بیمارستان آیت الله طالقانی تهران انجام گردید.

مواد و روشها

این مطالعه از نوع مورد- شاهدی و جامعه مورد بررسی، افراد مراجعه کننده به بیمارستان طالقانی دانشگاه شهید بهشتی تهران از سال۱۳۸۸ تا سال ۱۳۹۰ بودند. کلیه بیماران با یک یا تمام علائم مشکلات کیسه صفرا، شامل درد زیر دنده راست بالای شکم، تب و لرز، استفراغ و زردی مراجعه نموده و جهت تشخیص و درمان، توسط پزشک فوق تخصص مورد معاینه قرار گرفتند. پس از انجام آزمایشات سرم شناسی و در صورت نیاز، تایید نتایج حاصل از تشخیص اولیه با انجام ERCP برای خارج سازی سنگ، بیماران به منظور بررسی‌های ژنتیکی در این طرح تحقیقاتی معرفی شدند. در این مطالعه، تعداد ۱۰۰ بیمار که مبتلا به سنگ کیسه صفرا بوده و ۱۰۶ فرد سالم که سابقه خانوادگی ابتلا به سنگ کیسه صفرا را نیز نداشتند مشارکت کردند. از کلیه بیماران و شاهدها رضایت نامه کتبی اخذ شد و به آنها در مورد نحوه استفاده از نتایج و داوطلبانه بودن حق شرکت یا عدم شرکت در این مطالعه توضیح داده شد. فرم رضایت نامه اخلاقی شرکت افراد در مطالعه توسط کمیته اخلاق مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تصویب و مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام بررسی‌های ژنتیکی ابتدا نمونه خون از افراد تهیه شد و DNA ژنومی با روش استخراج نمکی که به وسیله میلر و همکاران شرح داده شده از کل خون استخراج شد (۱۶). در این آزمون برای شناسایی پلی مورفیسم rs11887534 ابتدا به وسیله روش PCR یک توالی ۴۰۶ نوکلئوتیدی ژن ABCG8 در دستگاه ترمو سایکلر تکثیر شد. خصوصیات پرایمر های طراحی شده مورد استفاده برای تکثیراین قطعه در جدول ۱ مشخص شده‌اند.

جدول ۱- خصوصیات پرایمرهای مورد استفاده

نام	توالی	طول	GC٪	Tm
Rs-11-forward	۵'TTATCTGATGTACCTTTAGCCAGCG – ۳'	۲۵	۴۴	۷۲
Rs-11-reverse	۵'ATGTCCTCACACTGCTTGATGTCC – ۳'	۲۴	۵۰	۷۲

واکنش PCR برای تکثیر توالی قطعه پروموتری این ژن با حجم نهایی 25µL در دستگاه ترموسایکلر اپندورف آلمان انجام گردید. برنامه چرخه دمایی برای تکثیر قطعه حاوی پلی‌مورفیسم D19H به شرح زیر می‌باشد:

ذوب شدن ابتدایی دو رشته DNA در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. چرخه اصلی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل مراحل ذوب شدن در دمای ۹۵ سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و در مرحله بعد اتصال و تکثیر در دمای ۷۲ سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ دقیقه بود که ۳۵ بار تکرار گردید. طراحی واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی با یک دمای اتصال و تکثیر برای این ناحیه برای اولین بار توسط محققین این مرکز انجام شد. در انتها، دمای ۷۲ سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای تکثیر نهایی انجام شد. برای بررسی محصولات PCR به طور کیفی و وجود یا عدم وجود محصول، الکتروفورز بر روی ژل آگارز انجام شد. بدین منظور، ژل آگارز ۱٪ تهیه شد و نمونه‌ها در میدان الکتریکی ۴ تا ۱۰ V/cm2 الکتروفورز شدند. با استفاده از نشانگر استاندارد، اندازه مورد نظر محصول PCR بررسی و ارزیابی شد. پس از پایان الکتروفورز ژل در

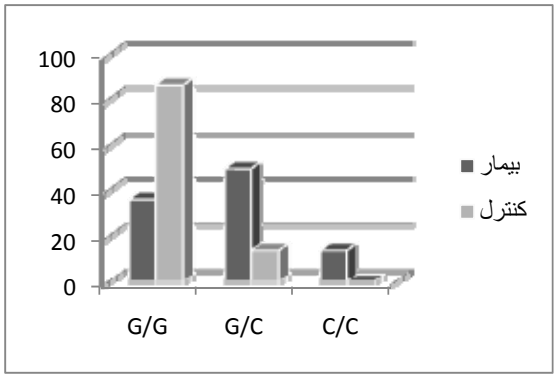
محلول اتیدیوم بروماید بـا غلظـت ۰.۵ µgr/ml رنـگ آمیـزی شد. پس از حصول اطمینان از تکثیر موفقیت آمیز قطعه ژنـی مورد نظر بر روی ژل آگارز، تعیین ژنوتیپ پلی‌مورفیسم در ژن ABCG8 به روش هضم آنزیمی محدود کننده صورت گرفـت. بـدین منظـور از آنـزیم محـدود کننـده BfuI (Fermentase) باغلظت ۷ U/µl استفاده شد. انتخاب آنزیم و طراحـی RFLP نیز به وسیله نرم افزار Web cutter 2.0 انجـام گشـت. تـوالی مورد شناسایی توسـط ایـن آنـزیم، GTATCC اسـت. پـس از مخلوط کردن آنزیم با محصول واکـنش زنجیـره ای پلیمـرازی نمونه ها به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس الگوی برش حاصله را از طریـق الکتروفـورز بـر روی ژل آگـارز ۳/۵ ٪ مـورد بررسـی قـرار داده و از الگوهـای حاصله عکس تهیه شد. برای تأیید ژنوتایپ های به دست آمده ۱۰٪ نمونه ها به وسیله کاربر دیگری مجـددا تعیـین ژنوتیـپ شدند که یافته‌ها نتایج پیشین را تأیید می‌کردند.

داده‌ها به وسـیله نـرم افـزار SPSS تحلیـل شـدند. در تحلیـل توصیفی از فراوانـی و درصـد فراوانـی و نیـز شـاخص مرکـزی میانگین و در آنـالیز تحلیلـی از تسـت کـای‌دو اسـتفاده شـد. سطح معنی‌دار آماری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بر اساس نتایج به دست آمده از واکنش آنزیمی محدود کننـده با آنزیم BfuI الگوی برش اختصاصی برای افراد هوموزیگـوت و هتروزیگـوت بـه دسـت آمـد. طـول قطعـه تکثیـر شـده ۴۰۶ نوکلئوتید بود که در صورت هوموزیگـوت بـودن بـرای الـل G (G/G) هیچ کدام از رشته ها برش نخـورده و قطعـه کامـل در ژن آگارز رویت شد. اما در صورت هموزیگوت بودن برای الل C (C/C) تمام رشـته‌هـا بـرش خـورده و دو قطعـه ۲۷۴ و ۱۳۲ نوکلئوتیدی مشاهده شد. در نهایت، افـراد هتروزیگـت (C/G) هرسـه قطعـه فـوق (۴۰۶، ۲۷۴ و ۱۳۲) را نمایـان سـاختند. یافته‌های فوق در دو گروه بیمار و شاهد مشاهده و مقایسه شد که فراوانی و درصـد فراوانـی حاصـل از آن در نمـودار ۱ قابـل مشاهده است.

در گروه بیماران، ۵۵٪ مرد و ۴۵٪ زن و در گروه شاهد ۴۸/۱٪ مـرد و ۵۱/۹٪ زن حضـور داشـتند (P= ۰/۱۹۸). همچنـین ۲۵/۳٪ بیماران سیگاری بوده و ۷۴/۷٪ آنها دخانیـات مصـرف نمی‌کردند، در حـالی کـه در گـروه شـاهد ۳۸/۲٪ سـیگاری و ۶۱/۸٪ غیرسیگاری بودند (P=۰/۷). سن ارتباط آمـاری معنـی داری با احتمال ابتلا به بیماری داشت (نسـبت شـانس: ۲/۴۶؛ فاصله اطمینان ۹۵٪: ۱۸/۰۹-۸/۳۹؛ P<۰/۰۰۱).



نمودار ۱- درصد فراوانی ژنوتیـپ‌هـای مـورد بررسـی در دو گـروه بیمار و شاهد

بررسی آماری نشان داد که ژنوتیـپ G/C نزدیـک بـه ۷ برابـر احتمـال ابـتلا بـه سـنگ کیسـه صـفرا را افـزایش مـی‌دهـد. آزمون‌های آماری با همسان سازی نمونه‌ها از نظر سـن انجـام شد تا عامل مداخله‌گری در این مطالعه نباشد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۲ مشخص شده است. یافته‌های حاصـل نشان دهنده این واقعیت بود که ژنوتیپ هتروزیگوت (G/C) در این ناحیه پلی‌مورف با احتمال ابتلا به سنگ کیسه صفرا رابطه مستقیمی دارد(نسبت شـانس: ۷/۱۴؛ فاصـله اطمینـان ۹۵٪: ۱۴/۶۶-۳/۴۷؛ P<۰/۰۰۱).

جدول ۲- تحلیل ژنوتیپ‌های پلی مورفیسم rs11887534 پس از همسان سازی نمونه‌ها از نظر سن

	P_{value}	نسبت شانس	فاصله اطمینان ۹۵٪
ژنوتیپ ها			
G/G		ref.	ref.
G/C	<۰.۰۰۱	۷/۱۴	۱۴/۶۶-۳/۴۷
C/C	۰/۹۹۸	۸/۱۵۴	۰-۰
الل ها			
G		ref.	ref.
C	۲/۸۲	۸/۳۹۶	۱۵/۲۵۳-۴/۶۶۲

بحث

سنگ کیسه صفرا در گـروه‌هـای سـنی متفـاوت و در جوامـع مختلف درصد ابـتلاء بـالایی را از خـود نشـان مـی‌دهـد. ایـن بیماری با بروز ۱۰ تا ۲۰ درصـد در جوامـع پیشـرفته یکـی از شایع‌ترین بیماری‌ها در حال حاضر می‌باشـد (۱۷). در صـورت

بروز، با غلایمی همچون درد، تب و زردی همراه بوده و نیاز به جراحی و برداشتن کیسه صفرا از اولویت‌های این بیماری است. سنگ‌های کلسترولی ۸۰ تا ۹۰ درصد این سنگ‌ها را در کشورهای غربی تشکیل می‌دهند (۴). علاوه بر عوامل محیطی شامل تغذیه، عوامل ژنتیکی نیز در ابتلا به این بیماری دخیل می باشند. چند شکلیD19H در احتمال ابتلا به بیماری‌های متعددی از جمله افزایش کلسترول و بیماری های قلبی مورد بررسی قرار گرفته است (۲۱-۱۸). همچنین ارتباط این چند شکلی با سنگ کیسه صفرا در جمعیت های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است (۲۲) که نشان دهنده اهمیت این ناحیه می‌باشد. طبق یافته‌های بوش و همکاران در یک مطالعه جامع ژنومی در ۲۰۰۷ بر روی بیش از ۵۰۰،۰۰۰ پلی‌مورفیسم در بیماران دارای سنگ کیسه صفرا، این چند شکلی ژنتیکی (D19H) به میزان ۲/۲ احتمال ابتلا به بیماری را افزایش می داد (فاصله اطمینان ۹۵٪: ۲/۶-۱/۸؛ P=۰/۰۰۱). ارتباط قوی‌تر این پلی‌مورفیسم با سنگ‌های کلسترولی (نسبت شانس ۳/۳) نشان داد که وجود هیستیدین به جای آسپارتیک اسید با انتقال بهینه کلسترول به صفرا ارتباط دارد (۱۷). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ توسط سیرواستاوا و همکاران بر روی یک جامعه هندی انجام شد، مشخص شد که وجود هیستیدین در این ناحیه در افزایش احتمال ابتلا به سنگ کیسه صفرا مؤثر است (نسبت شانس: ۱/۸۵؛ فاصله اطمینان ۹۵٪: ۳/۱-۱؛ P=۰/۰۲۷) (۲۱). همچنین این پلی‌مورفیسم در بیمارانی که دارای سرطان کیسه صفرا می‌باشند باعث افزایش تشکیل سنگ کیسه صفرا می‌شود. در مطالعه انجام شده در سال ۲۰۰۸ توسط کو و همکاران در یک جامعه چینی میزان کلسترول کلی سرم و سطح لیپوپروتئین‌های با چگالی بالا و پایین در بیماران مبتلا به سنگ کیسه صفرا به میزان قابل ملاحظه‌ای پایین‌تر از افراد سالم بود. حتی در هنگامی که داده‌ها از نظر سن و جنس یکسان سازی شدند، ژنوتایپ GC به میزان زیادی با این بیماری در ارتباط بود (نسبت شانس: ۳/۵؛ فاصله اطمینان ۹۵٪: ۹/۶-۱/۲؛ P=۰/۰۱۸). در این مطالعه با یکسان سازی داده‌ها از نظر سنی، خطر ژنتیکی گسترش سنگ کیسه صفرا تغییر پیدا کرد. طی این یافته‌ها در افرادی که سن آنها کمتر از ۵۰ سال بود، خطر ابتلا به سنگ کیسه صفرا افزایش یافت (۲۳). طی بررسی دیگری که در سال ۲۰۱۰ توسط سیداپورام و همکاران با توالی‌یابی مستقیم ناحیه ژنومی حاوی پلی مورفیسم انجام شد، ژنوتایپ D19H ارتباط مستقیمی را با ایجاد بیماری‌های صفراوی از خود نشان داد (نسبت شانس: ۲/۲۷۴؛ P=۰/۰۱۷). همچنین بررسی سرم بیماران و کلسترول صفراوی آنها ارتباط قوی با ژنوتایپ‌های این ناحیه را از خود نشان داد (۲۴). مشخص شده است که این چندشکلی با افزایش کلسترول پلاسما مرتبط است (۱۸). در مطالعه‌ای که بر روی خواهر و برادرهای مبتلا به سنگ کیسه صفرا انجام شد، نتیجه‌گیری شد که میزان تری‌گلیسرید و کلسترول در بیماران حامل الل G بسیار بیشتر از افراد سالم است (۲۳). در صورتی که این چند شکلی درافزایش تخلیه کلسترول به مایع صفراوی مؤثر باشد، تجمع کلسترول احتمال تشکیل سنگ کیسه صفرا را افزایش می‌دهد. وجود ارتباط بین ناحیه مورد بررسی در این تحقیق با احتمال ابتلا به سنگ کیسه صفرا با یافته‌های حاصل از مطالعات عملکرد بوش و همکاران تاییدی بر کارایی پروتئین حاصل از این ژن در انتقال کلسترول و احتمال ابتلا به سنگ کیسه صفرا است. طبق این یافته‌ها تغییر نوکلئوتیدی ناحیه مذکور باعث تغییر اسید آمینه در پروتئین ABCG8 می‌شود و این جابه‌جایی با کاهش کارایی انتقال کلسترول از کیسه صفرا و در نتیجه انباشته شدن کلسترول در کیسه صفرا و رسوب و تشکیل سنگ می‌شود. یافته‌های به دست آمده در این مطالعه و بررسی‌های سیداپورام و همکاران و کو و همکاران در رابطه با افزایش احتمال ابتلا به سنگ کیسه صفرا در افراد هتروزیگوت ارزش بالای بررسی بر روی این ژن و تاثیر قابل ملاحظه آن بر روی تشکیل سنگ کیسه صفرا را نشان می‌دهد و از آنجایی که ارزش این چند شکلی در جامعه مورد بررسی در این مطالعه بسیار بیشتر از جوامع دیگر است، فقدان اطلاعات کافی و نیاز به این تحقیق توسط مطالعه حاضر جبران شده است. از یافته-های حاصل می‌توان به عنوان منبعی برای تشخیص افراد مستعد طی یک آزمایش ساده استفاده کرد و با پیشگیری‌های به عمل آمده احتمال ابتلا به سنگ کیسه صفرا را کاهش داد. همچنین از این تعیین ژنوتیپ می‌توان برای ایجاد یک پنل تشخیصی پیش از ابتلا استفاده کرد. برای شناسایی یک پنل جامع، مطالعه دیگر ژن‌های دخیل و ژنوتیپ‌های آنها پیشنهاد می‌شود. همچنین می‌توان از آزمون‌های شناسایی میزان بیان پروتئین برای تعیین میزان تاثیرگزاری ژنوتیپ‌ها استفاده کرد که انجام این بررسی در مرحله بعد بسیار کارآمد خواهد بود.

REFERENCES

1. Acalovschi M, Pascu M, Iobagiu S, Petrescu M, Olinici CD, Ban A, et al. Increasing gallstone prevalence and cholecystectomy rate in a large Romanian town. A necropsy study. Dig Dis Sci 1995; 40:2582-86.

2. Lammert F, Sauerbruch T. Mechanisms of disease: the genetic epidemiology of gallbladder stones. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol 2005; 2:423-33.

3. Everhart JE, Yeh F, Lee ET, Hill MC, Fabsitz R, Howard BV, et al. Prevalence of gallbladder disease in American Indian populations: findings from the Strong Heart Study. Hepatology 2002; **35**: 1507-12.

4. Portincasa P, Moschetta A, Palasciano G. Cholesterol gallstone disease. Lancet 2006; 368:230-9.

5. Juran BD, Lazaridis KN. Applying genomics to the study of complex disease. Semin Liver Dis 2007; 27:3-12.

6. Carey MC, Paigen B. Epidemiology of the American Indians' burden and its likely genetic origins. Hepatology 2002; 36:781-91.

7. Wittenburg H, Lammert F. Genetic predisposition to gallbladder stones. Semin Liver Dis 2007; 27:109-21.

8. Miquel JF, Covarrubias C, Villaroel L, Mingrone G, Greco AV, Puglielli L, et al. Genetic epidemiology of cholesterol cholelithiasis among Chilean Hispanics, Amerindians, and Maoris. Gastroenterology 1998; 115:937-46.

9. Higgins CF, Callaghan R, Linton KJ, Rosenberg MF, Ford RC. Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein. Semin Cancer Biol 1997; 8:135-42.

10. Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance. Ann Rev Med 2002; 53:615-27.

11. Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. Ann Rev Cell Biol 1992; 8:67-113.

12. Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, et al. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. Science 2000; 290:1771-75.

13. Gylling H, Hallikainen M, Pihlajamäki J, Agren J, Laakso M, Rajaratnam RA, et al. Polymorphisms in the ABCG5 and ABCG8 genes associate with cholesterol absorption and insulin sensitivity. J Lipid Res 2004; 45:1660-65.

14. Hubácek JA, Berge KE, Stefková J, Pitha J, Skodová Z, Lánská V, et al. Polymorphisms in ABCG5 and ABCG8 transporters and plasma cholesterol levels. Physiol Res 2004; 53:395-401.

15. Plat J, Bragt MC, Mensink RP. Common sequence variations in ABCG8 are related to plant sterol metabolism in healthy volunteers. J Lipid Res 2005; 46:68-75.

16. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988; 16:1215.

17. Buch S, Schafmayer C, Völzke H, Becker C, Franke A, von Eller-Eberstein H, et al. A genome-wide association scan identifies the hepatic cholesterol transporter ABCG8 as a susceptibility factor for human gallstone disease. Nat Genet 2007; 39:995-9.

18. Koeijvoets KC, van der Net JB, Dallinga-Thie GM, Steyerberg EW, Mensink RP, Kastelein JJ, et al. ABCG8 gene polymorphisms, plasma cholesterol concentrations, and risk of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia. Atherosclerosis 2009; 204:453-58.

19. Szilvási A, Andrikovics H, Pongrácz E, Kalina A, Komlósi Z, Klein I, et al. Frequencies of four ATP-binding cassette transporter G8 polymorphisms in patients with ischemic vascular diseases. Genet Test Mol Biomarkers 2010; 14:667-72.

20. Chen ZC, Shin SJ, Kuo KK, Lin KD, Yu ML, Hsiao PJ. Significant association of ABCG8:D19H gene polymorphism with hypercholesterolemia and insulin resistance. J Hum Genet 2008; 53:757-63.

21. Srivastava A, Tulsyan S, Pandey SN, Choudhuri G, Mittal B. Single nucleotide polymorphism in the ABCG8 transporter gene is associated with gallbladder cancer susceptibility. Liver Int 2009; 29:831-37.

22. Rudkowska I, Jones PJ. Polymorphisms in ABCG5/G8 transporters linked to hypercholesterolemia and gallstone disease. Nutr Rev 2008; 66:343-48.

23. Kuo KK, Shin SJ, Chen ZC, Yang YH, Yang JF, Hsiao PJ. Significant association of ABCG5 604Q and ABCG8 D19H polymorphisms with gallstone disease. Br J Surg 2008; 95:1005-11.

24. Siddapuram SP, Mahurkar S, Duvvuru NR, Mitnala S, Guduru VR, Rebala P, et al. Hepatic cholesterol transporter ABCG8 polymorphisms in gallstone disease in an Indian population. J Gastroenterol Hepatol 2010; 25:1093-98.