

维生素 D 受体基因 *Bsm I* 多态性与北方汉族成人慢性肾功能不全骨密度的关系

王玉浔¹, 安雅臣^{2*}, 赵晓晶², 刘国荣², 高素玲², 张江², 王艳², 史国辉¹

(¹河北联合大学附属医院肾内科, ²神经内科, 河北唐山 063000)

[摘要] 目的:探讨维生素 D 受体(VDR)基因 *Bsm I* 位点多态性与北方汉族成人慢性肾功能不全骨密度的关系,探讨影响骨密度的遗传易感因素。方法:选取 211 名河北联合大学附属医院连续收治的汉族成人(年龄 ≥ 18 岁)慢性肾功能不全患者并根据血肌酐(Scr)水平分为肾功能不全组和肾功能衰竭组,采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)的方法检测 VDR 基因 *Bsm I* 多态性位点,对慢性肾功能不全相关的因素进行问卷调查,同时检测入院 24 h 内肝肾功能、血钾、钠、氯、钙、磷、甲状腺功能、甲状旁腺激素水平,及腰椎 L2~4、颈椎、Wards 三角部位骨密度。用 Pearson 相关分析进行年龄及体质指数(BMI)与骨密度关系的研究,用协方差分析的方法比较年龄、BMI 校正后各部位骨密度与 VDR 基因型之间的关系。结果:肾功能不全组和肾功能衰竭组 VDR 基因 *Bsm I* 多态性分布无统计学意义($\chi^2 = 0.088, P = 0.591$)。年龄、BMI 与骨密度的 Pearson 相关分析发现,年龄与各部位的骨密度呈负相关($P < 0.01$),BMI 与骨密度值呈正相关($P < 0.01$)。采用协方差分析对年龄与 BMI 进行校正后,对不同部位的骨密度值与 VDR 基因型相关性进行分析,发现 VDR 不同基因型间腰椎的骨密度值差异有统计学意义($P < 0.05$),aa 基因型具有较低骨密度($P < 0.05$)。结论:VDR 基因 *Bsm I* 位点多态性与慢性肾功能不全患者骨密度存在关联,可能是影响骨密度的遗传易感因素。

[关键词] 慢性肾功能不全;VDR 基因多态性;骨密度;聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析

[中图分类号] Q786

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)07-959-05

doi:10.7655/NYDXBNS20130721

The association of vitamin D receptor gene polymorphism and bone mineral density of patients with renal failure in Han Population in the northern China

Wang Yuxun¹, An Yachen^{2*}, Zhao Xiaojing², Liu Guorong², Gao Suling², Zhang Jiang², Wang Yan², Shi Guohui¹

(¹Department of Nephrology, ²Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Hebei United University, Tangshan 063000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the association between vitamin D receptor (VDR) gene polymorphism and the bone mineral density of the chronic renal failure patients in the northern China. **Methods:** A total of 211 patients with chronic renal failure coming from unrelated families in the northern China were selected. The subjects were divided into the chronic renal failure group ($n=110$) and the uremia group ($n=101$) by the level of serum creatinine. Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to detect VDR *Bsm I* polymorphisms. Information on environmental-related risk factors was collected using a pre-tested standard questionnaire. Bone mineral density was measured by dual energy X-ray absorptiometry. Concentration of serum intact parathyroid hormone was measured by radioimmunoassay. **Results:** According to the χ^2 test, there was no significant difference between the chronic renal failure group and the uremia group ($\chi^2 = 0.088, P = 0.591$). Age had significant negative correlation with bone mineral density ($P < 0.01$) while body mass index had significant positive correlation with bone mineral density ($P < 0.01$). Statistical differences of bone mineral density in lumbar were showed among different VDR genotypes ($P < 0.05$). People with aa genotype had significant lower bone mineral density in lumbar spine ($P < 0.05$) after correcting the body mass index and age. **Conclusion:** The results show that there is a possible correlation between the polymorphisms of VDR gene *Bsm I* and bone

[基金项目] 河北联合大学附属医院博硕科研基金(BS05009)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: anyachen007@126.com

mineral density in chronic renal failure patients in the northern China. It indicates that the restriction site polymorphisms of *Bsm* I gene may be used as a genetic markers.

[Key words] chronic renal failure; vitamin D receptor gene polymorphism; bone mineral density; polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism technique

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(7): 959-963]

慢性肾功能不全患者由于 1α 羟化酶减少致活性维生素 D3 的生成减少, 维生素 D 抵抗, 钙、磷代谢紊乱和继发性甲状旁腺功能亢进, 导致骨质疏松, 表现为骨密度 (bone mineral density, BMD) 减低, 成骨细胞数目和活力降低, 骨钙盐沉积不足, 骨组织形成障碍及自发性骨折等。

影响骨密度的相关基因多态性研究目前主要集中在维生素 D 受体 (vitamin D receptor, VDR) 基因、I 型胶原基因、降钙素受体基因、低密度脂蛋白受体相关蛋白基因及大麻素受体基因等^[1-3]。VDR 基因一直是研究最多也是最有争议的基因。VDR 基因多态性与骨密度的关系受到研究对象的种族和生活环境以及样本的选择标准和大小等多种因素的影响。目前我国北方汉族慢性肾功能不全患者 VDR 基因多态性与骨密度的关系的研究仍较少。本文以慢性肾功能不全患者为研究对象, 采用聚合酶链反应-限制性片断长度多态性 (PCR-RFLP) 方法分析北方汉族成人 VDR 基因 *Bsm* I 多态性, 探讨 VDR 基因 *Bsm* I 多态性与骨密度的关系。

1 对象和方法

1.1 对象

2012 年 1~6 月上旬在河北联合大学附属医院连续收治的汉族成人 (年龄 ≥ 18 岁) 慢性肾功能不全患者 211 例, 男 110 人 (52.1%), 女 101 人 (47.9%)。分为两组: ①慢性肾功能不全组: 血肌酐 (Scr) 133~443 $\mu\text{mol/L}$, 3 个月内 Scr 水平波动幅度小于 15%, 肾体积正常, 其中男 56 例 (50.9%), 女 54 例 (49.1%); ②肾功能衰竭组: Scr > 443 $\mu\text{mol/L}$, 其中男 52 例 (51.5%), 女 49 例 (48.5%)。排除标准: 年龄 > 65 岁, 3 个月内 Scr 水平波动幅度大于 15%, 合并影响骨代谢的疾病, 或服用过影响骨代谢的药物如雌激素、降钙素、二磷酸盐、维生素 D 和氟化物等, 月经不调, 神经性厌食, 过量饮酒, 过度肥胖或消瘦等患者。

1.2 方法

1.2.1 专用调查表的设计与应用

设计统一的专用调查表, 经过预调查及反复修订后正式应用。采用面对面问卷调查形式, 由经过统一培训的调查人员逐一询问调查表内容并认真填写, 内容包括研究对象出生年月、职业、文化程度、民族、婚姻状况、泌尿系统疾病史及其他重大疾病史、烟酒嗜好、饮食生活习惯、服药史; 同时检测入院 24 h 内肝肾功能、血钾、钠、氯、钙、磷、甲状腺功能、血甲状旁腺激素水平和腰椎 L2~4、颈椎、Wards 三角这 3 个部位的骨密度。

1.2.2 基因组 DNA 的获取

每个研究对象晨起空腹抽取静脉血 5 ml, 2% EDTA (0.5 ml) 抗凝, 冰盒保存。采用低渗溶血法分离白细胞。采用常规酚抽提法提取基因组 DNA。

1.2.3 聚合酶链反应 (PCR)

Bsm I 位点的引物设计^[4]: 5'-CAACCAAGACT-ACAAGTACCGCGTCAGTGA-3' 和 5'-AACCAGCG-GGAAGAGGTCAAGGG-3'。以上引物均由宝生物工程 (大连) 有限公司合成。PCR 反应体系: 反应的总体积为 25 μl , 其中 1 U *Taq* DNA 聚合酶, 10 \times PCR Buffer 2.5 μl , 上下游引物各 0.4 $\mu\text{mol/L}$, dNTPs 0.2 mmol/L, DNA 模板 1.0 μl , 无菌双蒸水 14.5 μl 。循环体系为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 共 40 个循环。扩增产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 以 DL-2000 为标准分子量, 样品在凝胶成像系统下照相。

1.2.4 限制性内切酶酶切分析

酶切体系为: PCR 产物 8 μl , *Bsm* I 限制性内切核酸酶 5 U, 10 \times L Buffer 2 μl , 无菌双蒸水 9 μl , 酶切体积为 20 μl 。

VDR 基因 *Bsm* I 位点基因型的判定: 取 10 μl 酶切产物, 加上样缓冲液 (6 \times Loading Buffer) 1.0 μl , 在 2% 琼脂糖凝胶 100 V 电压条件下电泳 25 min, 在紫外灯下观察, 部分样品在凝胶成像系统下照相。

1.3 统计学分析

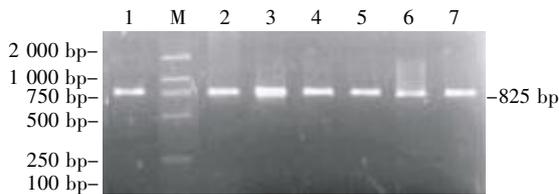
Excel2003 建立数据库, 采用基因计数法分别统计各组基因型和等位基因频率, 数据经 Hardy-weinberg 平衡检验后, SPSS11.5 统计软件进行统计分

析。用 Pearson 相关分析进行年龄及体质指数(BMI)与骨密度关系的研究,用协方差分析的方法比较年龄、BMI 校正后各部位骨密度和 VDR 基因型之间的关系。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VDR 基因多态性位点

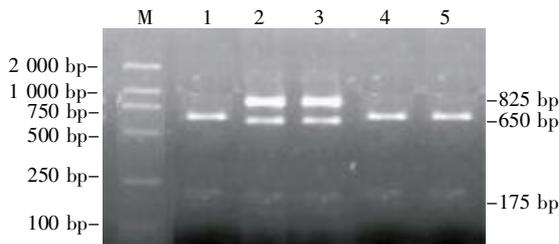
VDR 基因 *Bsm I* 位点 PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳结果见图 1, VDR 基因 *Bsm I* 位点限制性酶切分析结果见图 2。



M: DNA Marker DL-2000; 1~7: VDR 基因 *Bsm I* 位点 PCR 扩增产物。

图 1 VDR 基因 *Bsm I* 位点 PCR 扩增产物

Figure 1 PCR conducts of *Bsm I* gene



M: DNA Marker DL-2000; 1~5: *Bsm I* 限制性内切核酸酶酶切产物, 其中 2、3 是 *Bsm I* Bb 基因型, 1、4、5 是 *Bsm I* bb 基因型。

图 2 VDR 基因 *Bsm I* 位点 PCR-RFLP 产物

Figure 2 Restriction digestion of *Bsm I* gene

2.2 研究对象一般情况的比较

211 例患者按性别分层后肾功能不全组和肾功能衰竭组在年龄、BMI、免疫反应性甲状旁腺激素(immunoreactive parathyroid hormone, IPTH) 之间差异没有统计学意义, 在 Scr、 Ca^{2+} 、 P^{2+} 之间差异有统计

学意义, 表明随着病情的加重, 存在代谢性酸中毒、继发性甲状旁腺功能亢进、高磷血症等情况, 见表 1。

表 1 慢性肾功能不全患者一般情况的比较

Table 1 General comparison of patients with chronic renal insufficiency ($\bar{x} \pm s$)

项目	肾功能不全组	肾功能衰竭组	t 值	P 值
年龄(岁)				
男	42.9±7.2	43.3±7.4	0.284	0.875
女	41.5±6.8	42.2±7.0	0.510	0.776
BMI				
男	25.1±2.5 [▲]	24.9±2.4 [▲]	0.423	0.813
女	26.3±2.8 [▲]	25.8±2.2 [▲]	0.987	0.567
Scr(mmol/L)				
男	325.9±30.2	620.3±27.4 [▲]	52.920	0.000
女	316.5±26.8	632.2±37.1 [▲]	49.232	0.000
Ca^{2+} (mmol/L)				
男	2.0±0.2	1.5±0.4	7.601	0.001
女	2.0±0.2	1.5±0.3	11.181	0.000
P^{2+} (mmol/L)				
男	2.5±0.5	4.1±0.4	19.748	0.000
女	2.5±0.6	4.4±0.5	17.403	0.000
IPTH(pg/ml)				
男	188.8±37.2	190.3±41.6	0.199	0.912
女	187.9±39.4	189.2±47.4	0.150	0.934

▲: 组内男女不同性别之间比较, $P < 0.05$ 。

2.3 VDR 基因型和等位基因分布频率

肾功能不全组与肾功能衰竭组 VDR 基因型与等位基因分布频率见表 2。经 HWE 软件检验本次实验人群 VDR 基因型频率分布均符合 Hardy-Weinberg 定律($\chi^2 = 1.021, P = 0.233$)。各组之间经 χ^2 检验, 肾功能不全组和肾功能衰竭组 VDR 基因 *Bsm I* 多态性分布无统计学意义($\chi^2 = 0.088, P = 0.591$)。

2.4 年龄、BMI 与各部位骨密度的相关性分析

对腰椎 L2~4、颈椎、Wards 三角 3 个部位的骨密度进行测定, 其结果与年龄、BMI 的 Pearson 相关分析发现, 年龄与各部位的骨密度呈负相关 ($P < 0.01$), BMI 与骨密度值呈正相关 ($P < 0.01$)。说明年

表 2 VDR 基因型和等位基因分布频率

Table 2 Distribution frequencies of VDR genotype and allelomorphic gene [n(%)]

组别	Bsm I 基因型			等位基因	
	bb	Bb	BB	B	b
肾功能不全组					
男(n=56)	16(28.6)	28(50.0)	12(21.4)	52(46.4)	60(53.6)
女(n=54)	19(35.2)	24(44.4)	11(20.4)	46(42.6)	62(57.4)
肾功能衰竭组					
男(n=52)	18(34.6)	24(46.2)	10(19.2)	44(42.3)	60(57.7)
女(n=49)	17(35.7)	25(50.0)	7(14.3)	39(39.8)	59(60.2)

龄与 BMI 均影响不同部位骨密度值,见表 3。

表 3 年龄、BMI 与各部位骨密度的相关性分析

Table 3 Correlativity analysis of age, BMI and various parts of the bone mineral

测量部位	年龄		BMI	
	r 值	P 值	r 值	P 值
腰椎 L2-4	-0.428	0.000	0.466	0.000
颈椎	-0.373	0.000	0.176	0.002
Wards 三角	-0.415	0.000	0.233	0.001

2.5 年龄、BMI 校正后各部位骨密度值与 VDR 基因型的相关性

采用协方差分析在对年龄与 BMI 进行校正后,对不同部位的骨密度值与 VDR 基因型相关性进行分析,发现 VDR 不同基因型间腰椎的骨密度值差异有统计学意义 ($P < 0.05$),BB 基因型具有较低骨密度 ($P < 0.05$),见表 4。

表 4 年龄、BMI 校正后各部位骨密度值与 VDR 基因型的相关性分析

Table 4 Correlativity analysis between bone mineral density value and VDR genotype after the adjustment of age and BMI ($g/cm^2, \bar{x} \pm s$)

测量部位	VDR 各基因型骨密度值			P 值
	bb	Bb	BB	
腰椎 L2-4	0.968±0.066	0.947±0.036	0.887±0.053	0.027
颈椎	0.844±0.048	0.826±0.075	0.822±0.045	0.219
Wards 三角	0.646±0.083	0.641±0.044	0.630±0.074	0.420

3 讨论

VDR 基因位于 12 号染色体(12q13.1)上,长度超过 100 kb,基因转录产物为 VDR 蛋白。自 1994 年 Morrison^[5]等经实验证明 VDR 基因多态性与骨密度密切相关,此后,在世界范围内对这一发现进行了多次重复实验^[6]。这些研究绝大多数是研究 VDR 基因 *Bsm I* 多态性与骨密度的相关性,对 VDR 基因的 *Bsm I* 多态性的研究较少,故本研究选择 VDR 基因 *Bsm I* 的多态性作为研究对象。本研究表明,虽然肾功能不全组和肾功能衰竭组 VDR 基因 *Bsm I* 多态性分布差异无统计学意义,但是采用协方差分析对年龄与 BMI 进行校正后,对不同部位的骨密度值与 VDR 基因型相关性进行分析,发现腰椎的骨密度值与 VDR 不同基因型的差异有统计学意义 ($P < 0.05$),BB 基因型具有较低骨密度 ($P < 0.05$),表明 VDR 基因 *Bsm I* 多态性对慢性肾功能不全患者骨密度起着重要的作用,而 Fernández^[7]等研究提示

VDR 基因 B 等位基因可能是慢性肾衰竭不易发生继发性甲状旁腺功能亢进的因素,慢性肾衰竭 BB 基因型患者甲状旁腺功能低下、骨转运降低的危险性高,这与本研究是一致的。

目前对 VDR 基因多态性影响骨代谢的确切机制尚不完全明确,可能与下列机制有关^[8-9]。①受体的非基因作用:1,25-二羟基维生素 D₃[1,25-(OH)₂D₃]促进小肠转运钙的效应,可能是通过它与 VDR 的复合物直接促进钙在细胞内质网小泡内集聚,再转移到溶酶体而实现的。②受体的基因作用:1,25-(OH)₂D₃在细胞核与 VDR 结合,形成激素-受体复合物,复合物磷酸化后,特异性结合于 DNA 分子上维生素 D 控制基因,使 mRNA 合成增加或减少,致使相应蛋白合成增加或减少,出现不同的生物效应。③VDR 基因活力改变可影响其他激素受体(如雌激素、甲状腺素、胰岛素、降钙素)活性而间接影响骨代谢。

很多研究表明,VDR 基因无论是 *Bsm I*, *Taq I*, *Bsm I* 还是 *Fok I*, VDR 基因多态性对正常人群的骨密度均有影响;但也有研究表明 VDR 基因多态性对正常人群的骨密度无影响。为此有学者对 VDR 基因多态性与骨密度的关系进行 Meta 分析^[10-12],其结果表明 VDR 基因多态性与骨密度具有相关性,但其对骨密度的作用小。本研究以慢性肾功能不全患者为研究对象,首次通过协方差分析的方法对北方汉族成人 VDR 基因多态性和骨密度的相关性进行了研究,发现特定的基因型有低骨密度的存在,这为北方汉族成人慢性肾功能不全患者的基因诊断和治疗提供了理论基础,并对早期诊断筛查骨质疏松高危人群,尽早进行治疗和预防有重要的意义。

[参考文献]

- [1] Ralston SH, Uitterlinden AG, Brandi ML, et al. Large-scale evidence for the effect of the COL1A1 Sp1 polymorphism on osteoporosis outcomes; the GENOMOS study [J]. *PLoS Med*, 2006, 3(4): e90
- [2] Funakoshi Y, Omori H, Yada H, et al. Relationship between changes of BMD over seven years and A1330V polymorphism of the low-density LPR5 gene in Japanese female workers [J]. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2010, 19(4): 534-539
- [3] Karsak M, Malkin I, Toliat MR, et al. The cannabinoid receptor type 2 (CNR2) gene is associated with hand bone strength phenotypes in an ethnically homogeneous family sample [J]. *Hum Genet*, 2009, 126(5): 629-636

- [4] Fountas L, Moutsatsou P, Kastanias I, et al. The contribution vitamin D receptor gene polymorphisms in osteoporosis and familial osteoporosis [J]. *Osteoporos Int*, 1999, 10(5):392-398
- [5] Morrison NA, Qi JC, Tokita A, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles [J]. *Nature*, 1994, 367(6460):284-287
- [6] McClean E, Archbold GP, Taggart HM. Do the COL1A1 and Taq 1 vitamin D receptor polymorphisms have a role in identifying individuals at risk of developing osteoporosis? [J]. *Ulster Med J*, 2003, 72(1):26-33
- [7] Fernández E, Fibla J, Betriu A, et al. Association between vitamin D receptor gene polymorphism and relative hypoparathyroidism in patients with chronic renal failure [J]. *J Am Soc Nephrol*, 1997, 8(10):1546-1552
- [8] Mocharla H, Butch AW, Pappas AA, et al. Quantification of vitamin D receptor mRNA by competitive polymerase chain reaction in PBMC: lack of correspondence with common allelic-variants [J]. *J Bone Miner Res*, 1997, 12(5):726-733
- [9] Mishra DK, Wu Y, Sarkissyan M, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and prognosis of breast cancer among African-American and Hispanic women [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3):e57967
- [10] Gong G, Stern HS, Cheng SC, et al. The association of bone mineral density with vitamin D receptor gene polymorphisms [J]. *Osteoporos Int*, 1999, 9(1):55-64
- [11] Hussien YM, Shehata A, Karam RA. Polymorphism in vitamin D receptor and osteoprotegerin genes in Egyptian rheumatoid arthritis patients with and without osteoporosis [J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(5):3675-3680
- [12] Sanwalka N, Khadilkar A, Chiplonkar S. Vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mass indices in post-menarchal Indian adolescent girls [J]. *J Bone Miner Metab*, 2013, 31(1):108-115

[收稿日期] 2013-02-18

参考文献的著录格式

1. 期刊

[顺序号] 作者. 题名[J]. 刊名, 年份, 卷号(期号): 起止页码

示例:

[1] 徐春阳, 杨荣, 张浩, 等. *NOMO1* 基因在大鼠胚胎心脏发育过程中的表达 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2013, 32(6): 728-731

[2] Li JZ, Bunney BG, Meng F, et al. Circadian patterns of gene expression in the human brain and disruption in major depressive disorder [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(24):9950-9955

2. 专著

[顺序号] 作者. 书名[M]. 版本. 出版地: 出版者, 年份: 起止页码

示例:

[3] 何维. *医学免疫学* [M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 136

3. 析出文献

[顺序号] 析出文献责任者. 析出文献题名[M]//. 析出文献其他责任者或专著主要责任者. 专著题名: 其他题名信息. 出版地: 出版者, 年份: 析出文献起止页码

示例:

[4] 林穗芳. *美国出版业概况* [M]//陆本瑞. *世界出版概况*. 北京: 中国书籍出版社, 1991: 1-23

[5] 钟文发. *非线性规划在可燃毒物配置中的应用* [C]//赵玮. *运筹学的理论与应用: 中国运筹学会第五届大会论文集*. 西安: 西安电子科技大学出版社, 1996: 468-471

(本刊编辑: 接雅俐)