

· 临床研究 ·

维生素 D 缺乏性佝偻病遗传易感性的研究

吴胜虎, 余晓丹, 颜崇淮, 沈理笑, 余晓刚, 张燕萍, 张劲松, 金星明, 沈晓明

(上海第二医科大学附属新华医院上海儿童医学中心儿童保健科, 上海 200092)

[摘要] 目的 遗传因素是否参与维生素 D 缺乏性佝偻病目前尚未明了。拟通过研究维生素 D 受体基因多态性与维生素 D 缺乏性佝偻病易感性的相关性, 探讨维生素 D 缺乏性佝偻病的遗传易感性。方法 应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)分析技术检测 159 例维生素 D 缺乏性佝偻病儿童和 78 例正常儿童(对照组)维生素 D 受体(VDR)基因 FokI 位点的多态性, 比较两组之间 VDR 基因型和等位基因的频率。结果 维生素 D 缺乏性佝偻病患者和对照组儿童的 VDR 基因 FokI 位点基因型分布频率分别为: FF(37%), Ff(51%), ff(12%) 和 FF(18%), Ff(55%), ff(27%), 两组之间的差异有显著性($\chi^2_{0.01(2)} = 9.210$, $\chi^2 = 13.3880$, $P < 0.01$); 佝偻病患者和对照组儿童的 VDR 基因 FokI 位点等位基因分布频率分别为: F(63%), f(37%) 和 F(46%), f(54%), 两组之间的差异有显著性($\chi^2 = 6.18$, $P < 0.05$)。佝偻病患者 F 等位基因分布频率明显高于对照组人群(63% vs 46%) 两组之间的差异有显著性; 而佝偻病患者 f 等位基因频率显著低于对照组(37% vs 54%)。结论 VDR 基因 FokI 酶切位点的多态性可能与维生素 D 缺乏性佝偻病的遗传易感性有关。

[中国当代儿科杂志, 2006, 8(2): 121-124]

[关键词] 维生素 D 受体; 基因多态性; 维生素 D 缺乏性佝偻病; 儿童

[中图分类号] R591.44 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2006)02-0121-04

Association between vitamin D receptor gene polymorphism and vitamin D deficiency rickets

WU Sheng-Hu, YU Xiao-Dan, YAN Chong-Huai, SHEN Li-Xiao, YU Xiao-Gang, ZHANG Yan-Ping, ZHANG Jin-Song, JIN Xing-Ming, SHEN Xiao-Ming. Department of Child Health Care, Shanghai Institute for Pediatric Research, Xinhua Hospital, Second Medical University, Shanghai 200092, China (Email: wshenghu@hotmail.com)

Abstract: Objective To explore the genetic susceptibility of children to vitamin D deficiency rickets through studying the association between Vitamin D receptor(VDR) gene polymorphism and vitamin D deficiency rickets. **Methods** One hundred and fifty-nine children (100 boys and 59 girls, aged 0 to 2 years), with new-onset vitamin D deficiency rickets were enrolled. The patients sampled from a community of Jiamusi City, Heilongjiang Province. Seventy-eight healthy age-matched children (46 boys and 32 girls) were used as the controls. VDR gene polymorphism (cleaved by restriction endonuclease FokI) was analyzed by polymerase chase reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The frequencies of the VDR genotype and allele were compared between the two groups. **Results** The frequencies of FF, Ff and ff genotypes were 37%, 51% and 12% in the Rickets group, and 18%, 55% and 27% in the Control group. A significant difference was found in the frequency distribution of the VDR genotype between the two groups ($\chi^2_{0.01(2)} = 9.210$, $\chi^2 = 13.3880$, $P < 0.01$). In the Rickets group, f allele frequency was lower (37% vs 54%), while the F allele was more common than the Control group (63% vs 46%). **Conclusions** There is an association between the VDR gene Fok I polymorphism and vitamin D deficiency rickets. The individuals with the F allele are more susceptible to vitamin D deficiency rickets.

[Chin J Contemp Pediatr, 2006, 8(2): 121-124]

Key words: Vitamin D receptor; Polymorphism; Vitamin D deficiency rickets; Child

维生素 D 缺乏性佝偻病(简称佝偻病)目前仍然是严重危害我国儿童健康的常见营养性疾病之一。既往的研究发现, 营养和环境因素是佝偻病发

病的重要决定因素, 但遗传因素是否参与其中目前尚不明了。迄今对其遗传学方面致病机制的研究仍较少。本研究拟通过分子流行病学方法研究维生素

[收稿日期] 2005-09-27; [修回日期] 2005-11-28

[基金项目] 本课题受上海市重点学科建设项目(编号: T0204) 和上海市高等学校青年基金项目资助(编号: 02BQ21)。

[作者简介] 吴胜虎, 男, 博士, 主治医师。主攻方向: 儿童保健。

[通讯作者] 沈晓明, 教授, 上海第二医科大学附属新华医院, 邮编: 200092

D受体(vitamin D receptor, VDR)基因 Fok I 位点多态性与佝偻病的相关性,以探讨佝偻病发生的遗传易感性。

1 对象与方法

1.1 对象

研究对象均为黑龙江省佳木斯市某地区 0~2 岁汉族儿童,相互间无血缘关系。

1.1.1 佝偻病组 以 1986 年卫生部颁发的《婴幼儿佝偻病防治方案》为诊断标准,并根据临床表现、左腕关节 X 线片和参考血骨碱性磷酸酶(bone alkaline phosphatase, BALP)等,参照第 7 版《实用儿科学》“维生素 D 缺乏性佝偻病”章节,确定佝偻病组入选对象。所有研究对象均除外遗传性骨代谢性疾病。整群抽取 0~2 岁临床上有活动期佝偻病症状和体征(如夜惊、烦躁、多汗、鸡胸、漏斗胸、X 型腿等)的儿童 159 例,系 2003 年 10 月至 2004 年 10 月该地区新发的佝偻病患者。男 100 例,女 59 例。年龄 0.5~24 月,平均 10.1 月。

1.1.2 对照组 同期随机抽取 78 例正常儿童。男 46 例,女 32 例。年龄 2~24 月,平均 13.2 月。

1.2 方法

1.2.1 问卷调查

(1)调查问卷:为佝偻病家庭社会和营养因素调查表。调查的主要内容包括儿童年龄、性别、母孕期日照及维生素 D 与钙的摄入史、儿童的喂养方式、儿童每天膳食牛奶摄入、维生素 D 及钙剂的补充情况、儿童每天日照时间及户外活动情况、有否骨折病史、有否慢性疾病史、有否长期服用影响骨代谢的药物史等。并对每个变量按统一标准进行相应的赋值。

(2)调查方法:由经过严格培训的儿科专业医师专人按照设计方案要求,询问儿童家长。

(3)调查问卷信度的考核:时间信度的考核:随机选择 20 份问卷,在初次问卷结束后间隔 1 个月再次以同样的问卷询问这些入选儿童的家长,然后进行一致性检验。经 Kappa 检验,所有变量的 Kappa 值均介于 0.75~1,表明调查问卷的时间信度较好。

二人信度的考核:由经过严格培训的 1 名儿科专业医师专人按照设计方案进行问卷调查,可基本排除不同询问者之间的误差。

1.2.2 实验室检查 基因组 DNA 抽提:采集静脉血 4 mL,EDTA 抗凝。用基因组 DNA 抽提试剂盒提取 DNA, -20℃ 保存。

PCR 扩增:以下述序列作为 PCR 扩增的引物:

P₁: AGCTGGCCCTGGCACTGACTGACTCTGCTCT, P₂: ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC。反应总体积为 25 μL。反应条件为:95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 40 s, 60℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 40 s, 循环 30 圈, 72℃ 延伸 7 min。

限制性内切酶酶切鉴定:将 1mg 扩增产物加入到含限制性内切酶 FokI 5 U 的体系中, 37℃ 消化 4 h。酶切产物用 2% 的琼脂糖胶电泳分析基因型。其中, Ff(265 bp, 196 bp, 69 bp); ff(196 bp, 69 bp); FF(265 bp)。

基因测序:取经过内切酶酶切鉴定确定为 FF、Ff、ff 型的 PCR 产物各 5 例, 由上海申能博彩应用 ABI 377 测序仪进行测序。

1.3 数据处理

用基因计数法分别统计病例组和对照组 FokI 基因型及其等位基因的分布频率, 数据先经 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验后, 采用 Statistics 4.5 for Windows 进行统计分析。两组之间的基因型和等位基因分布频率的差异用 χ^2 检验。然后进行单因素相关分析, 筛选出对佝偻病的发病有统计学意义的变量, 再以所有变量为自变量, 以佝偻病为因变量进行多元逐步回归分析, 以评价 FokI 基因多态性对佝偻病发病的贡献。统计学检验水平 $\alpha = 0.05$ (双侧), $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 VDR 基因型的酶切鉴定

VDR 基因型酶切鉴定见图 1。

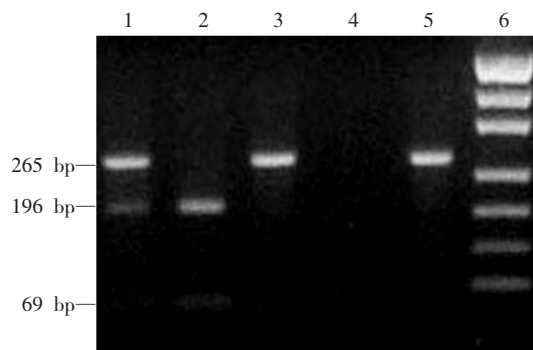


图 1 琼脂糖凝胶电泳图。FokI: 1: Ff(265, 196, 69 bp); 2: ff(196, 69 bp); 3: FF(265 bp); 4: 阴性对照; 5: 酶切前; 6: pUC19/MspI DNA Marker。

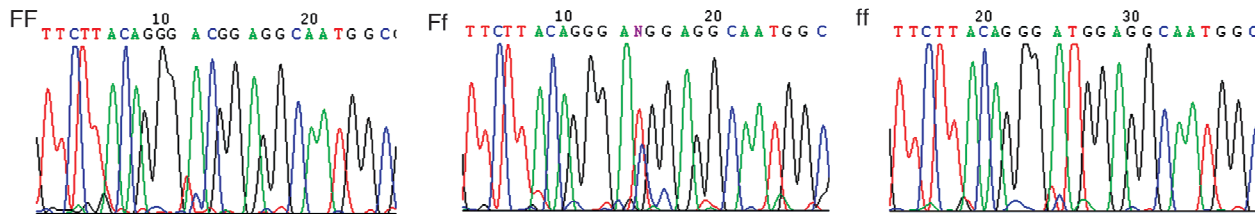


图2 VDR 基因 FokI 位点多态性测序图

2.2 VDR 基因测序结果

通过基因测序证实:通过对酶切产物进行基因序列测定,结果证实:FF 基因型 VDR 基因在 5'端发生 T→C 的突变,起始密码子均由 ATG 突变为 ACG,仅在其下游 6 个核苷酸后存在正常的 ATG 起始密码子;而 ff 基因型 VDR 基因 5'端存在两个相隔 6 个核苷酸的起始密码子 ATG(见图 2)。

2.3 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验

为评价基因频率估计的可靠性,对 FokI 基因型的分布进行了 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验。经统计学检验,VDR 基因 FokI 位点等位基因分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡(病例组: $\chi^2 = 1.2811$, $P > 0.05$;对照组: $\chi^2 = 0.8342$, $P > 0.05$),说明该组资料具有较好的代表性。

2.4 佝偻病组与对照组 VDR 基因型和等位基因分布频率的比较

VDR 基因 FokI 位点多态性与佝偻病之间关系见表 1。佝偻病组和对照组儿童的 VDR 基因 FokI 位点基因型分布频率比较差异有显著性($P < 0.01$);两组儿童的 VDR 基因 FokI 位点等位基因分布频率比较差异有显著性($\chi^2 = 6.18$, $P < 0.05$)。佝偻病患者 F 等位基因分布频率明显高于对照组人群(63% vs 46%)两组之间的差异有显著性;而佝偻病患者 f 等位基因频率显著低于对照组(37% vs 54%)。

表 1 佝偻病组与对照组 VDR 基因型和等位基因分布频率的比较 (%)

组别	例数	VDR 基因型频率 ^a			等位基因频率 ^b	
		FF	Ff	ff	F	f
对照组	78	18	55	27	46	54
佝偻病组	159	37	51	12	63	37

a $\chi^2_{0.01(2)} = 9.210$, $\chi^2 = 13.3880$, $\chi^2 > \chi^2_{0.01(2)}$, $P < 0.01$; b $\chi^2 = 6.18$, $P < 0.05$

2.5 VDR 基因多态性与佝偻病易感性之间关系的多元逐步回归分析

VDR 基因多态性与佝偻病易感性之间关系的

多元逐步回归分析见表 2。

表 2 VDR 基因多态性与佝偻病易感性之间关系的多元逐步回归分析结果

变量	t	P
FokI	-4.3368	0.0000
出生体重	2.4032	0.0171
出生身长	-2.2058	0.0285
母孕期每天日照时间	-2.6460	0.0088
出生至检查时补充维生素 D	-2.0821	0.0385
现每天食乳制品	-2.4794	0.0139
现儿童每天日照时间	-3.5708	0.0004

以调查问卷中 29 个变量及 VDR 基因多态性为自变量,以佝偻病的发病为应变量,采用多元逐步回归分析,以排除混杂因素的干扰。通过多元逐步回归分析发现,最终进入儿童佝偻病回归方程共有 7 个变量:FokI、出生体重、出生身长、母孕期每天日照时间、儿童出生至今补充维生素 D、儿童每天乳制品摄入量及儿童每天日照时间,它们对佝偻病发生的显著贡献在排除混杂因素的作用后依然存在。

3 讨论

VDR 基因多态性与疾病的关系已经受到研究者的密切关注^[1-3]。国内关于 VDR 基因多态性与佝偻病之间的关系研究刚刚起步,李筠等^[4-7]分别研究了 Bsm I, FokI, Taq I 等位点多态性与佝偻病易感性之间的关系,但研究结果并不一致。

本研究结果显示,佝偻病患者和对照组儿童的 VDR 基因 FokI 位点基因型和等位基因分布频率差异有显著性意义。佝偻病患者 F 等位基因分布频率明显高于对照组人群(63% vs 46%);而佝偻病患者 f 等位基因频率明显低于对照组(37% vs 54%)。这个研究结果与 Fischer 等^[1]的研究报道一致。并且 FokI 位点基因多态性与佝偻病之间的关系在经过多因素分析,排除了混杂因素的影响后依然存在,这提示 FokI 位点基因多态性可能与中国汉族佝偻病患

儿遗传易感性有关。经优势比分析发现,佝偻病组等位基因 F 的 OR 值为 1.99,OR 值 95% 可信区间为 (1.1555, 3.4273), $\chi^2 = 6.1558$, $P < 0.05$, 说明 VDR 基因等位基因 F 可能增加机体对佝偻病的易感性。

(致谢: 特别感谢黑龙江省佳木斯市妇幼保健院徐凤兰、邱艳杰、于晓波等医师的大力支持和帮助。)

[参 考 文 献]

- [1] Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA. Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(15): 6665-6669.
- [2] Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles

- [J]. Nature, 1994, 367(6460): 284-287.
- [3] Fischer PR, Thacher TD, Pettifor JM, Jorde LB, Eccleshall TR, Feldman D. Vitamin D receptor polymorphisms and nutritional rickets in Nigerian children [J]. J Bone Miner Res, 2000, 15(11): 2206-2210.
- [4] 李筠, 孙琼. VDR 基因多态性与营养性佝偻病的关联研究 [J]. 浙江医学, 1999, 21(2): 69-70.
- [5] 王光, 孙利伟, 焦立新, 陈琦, 刘愉, 刘宇奇, 等. 佝偻病患儿维生素 D 受体基因多态性的研究 [J]. 中华儿科杂志, 2004, 42(10): 788-789.
- [6] 卢华君, 李海林, 郝萍, 李继梅, 周丽芳. 维生素 D 受体基因多态性与维生素 D 缺乏性佝偻病易感性的研究 [J]. 中华儿科杂志, 2003, 41(7): 493-496.
- [7] 龚晓辉, 李海林, 黄永坤, 郝萍, 周丽芳. 维生素 D 受体基因 TAQ I 多态性及其缺乏性佝偻病易感因素研究 [J]. 中国儿童保健杂志, 2004, 12(6): 481-483.

(本文编辑: 吉耕中)

· 消息 ·

第十届全国儿科呼吸系统疾病学术会议征文通知

中华医学会儿科学分会呼吸学组、中华儿科杂志编辑部定于 2006 年 9 月上旬召开“第十届全国儿科呼吸系统疾病学术会议”。会议将围绕儿童急慢性呼吸道感染(包括肺部结核)、哮喘及相关疾病、其他呼吸系统疾病以及全身疾病的呼吸系统表现、呼吸系统影像学、肺功能检查等进行交流和讨论。会议还将邀请国内外知名专家进行专题讲座,并评出优秀论文予以奖励。现向全国儿科医护人员征集稿件,欢迎大家踊跃投稿。

1、征文主要内容:

(1) 急慢性呼吸道感染的诊断技术和防治进展;(2) 儿童哮喘和过敏性鼻炎等呼吸系统变态反应性疾病的基础和临床研究;(3) 儿童咳嗽的诊断和治疗;(4) 反复呼吸道感染诊治方案的探讨;(5) 儿童结核病的防治经验;(6) 儿科其他呼吸系统疾病的诊治体会、呼吸系统影像学、肺功能检查等。

2、征文要求:

(1) 文章内容应具有科学性、创新性和实用性;

(2) 来稿必须是未公开发表过的学术性论文;(3) 请根据会议主题撰文,全文 1 份(限 3000 - 4000 字),摘要一式两份(600—800 字),论著应包括目的、方法、结果、结论四部分;并请加盖单位公章或附单位介绍信。来信请寄至北京东四西大街 42 号《中华儿科杂志》编辑部(邮编:100710),联系人:江澜。;(4) 可以网上投稿,“主题”请注明“呼吸会议征文”,并发送到 jiangl@cma.org.cn 或 w-jianglan@263.net;(5) 每篇征文需同时寄稿件处理费 10 元;(6) 征稿截止日期为 2006 年 7 月 10 日(以邮戳为准),不录用的稿件概不退稿,请自留底稿。

3、被录入的文章将被编入“论文汇编”,其中,优秀论文将在中华儿科杂志有关栏目刊出。参加会议者,将颁发论文证书并获国家 I 类继续教育学分。

4、会议地点和具体日期另行通知。

中华医学会儿科学分会呼吸学组

2006 年 2 月