

论著 · 临床研究

佝偻病维生素 D 受体基因多态性 与 25-羟维生素 D₃ 相关性

弓毅谷 李宇宁 张维华 刘丽君 康曦光

(兰州大学第一医院儿科,甘肃 兰州 730000)

[摘要] 目的 研究 1~3 岁佝偻病患者中维生素 D 受体基因多态性 Fok I 位点与佝偻病相关性,初步探讨维生素 D 受体基因多态性 Fok I 位点在佝偻病发病中的作用。**方法** 病例组(佝偻病患者)62 例与对照组(正常健康儿童)60 例,用 ELISA 方法检测血清 25-羟维生素 D₃ 水平,比较两组之间血清 25-羟维生素 D₃ 水平。用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)检测病例组和对照组维生素 D 受体基因多态性 Fok I 位点,比较两组之间基因型和等位基因分布频率。**结果** 病例组血清 25-羟维生素 D₃ 水平较对照组明显降低,差异有统计学意义(9.1 ± 4.1 ng/mL vs 16.1 ± 6.9 ng/mL; $P < 0.05$)。维生素 D 受体基因多态性 Fok I 位点病例组 FF 基因型明显高于对照组(53% vs 25%),基因型分布频率差异有统计学意义($\chi^2 = 10.221, P < 0.05$),病例组 F 等位基因频率明显高于对照组(73% vs 57%),等位基因分布频率差异有统计学意义($\chi^2 = 7.511, P < 0.05$)。**结论** 维生素 D 受体基因多态性 Fok I 位点与佝偻病有相关性,提示其在佝偻病遗传易感性方面起重要作用。

[中国当代儿科杂志,2010,12(7):544-546]

[关键词] 维生素 D 缺乏性佝偻病;维生素 D 受体基因多态性;25-羟维生素 D₃;儿童

[中图分类号] R591.44 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)07-0544-03

Correlation between vitamin D receptor genetic polymorphism and 25-hydroxyvitamin D₃ in vitamin D deficiency rickets

GONG Yi-Gu, LI Yu-Ning, ZHANG Wei-Hua, LIU Li-Jun, KANG Xi-Guang. Department of Pediatrics, First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China (Li Y-N, Email:tiger19621962@163.com)

Abstract: Objective To study the correlation between vitamin D receptor genetic polymorphism Fok I and vitamin D deficiency rickets in children between 1 to 3 years old, and to explore the significance of hereditary factors in the development of vitamin D deficiency rickets. **Methods** Sixty-two children with vitamin D deficiency rickets and 60 healthy children as a control group were enrolled. Serum levels of 25-hydroxyvitamin D₃ were measured using ELISA. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) genetic analysis method was used. A restriction fragment length polymorphism in the vitamin D receptor genetic polymorphism Fok I was tested. The frequencies of the vitamin D receptor genotype and allele were compared between the two groups. **Results** Serum 25-hydroxyvitamin D₃ levels in the rickets group were significantly lower than those in the control group (9.1 ± 4.1 ng/mL vs 16.1 ± 6.9 ng/mL; $P < 0.05$). FF genotype in the vitamin D receptor genetic polymorphism Fok I was more common in the rickets group than in the control group (53% vs 25%; $P < 0.05$). F allele frequency in the rickets group was significantly higher than that in the control group (73% vs 57%; $P < 0.05$). **Conclusions** There is a correlation between vitamin D receptor genetic polymorphism Fok I and vitamin D deficiency rickets. This suggests that vitamin D receptor genetic polymorphism might play an important role in determining susceptibility to development of vitamin D deficiency rickets.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (7):544-546]

Key words: Vitamin D deficiency rickets; Vitamin D receptor genetic Polymorphism; 25-hydroxyvitamin D₃; Child

维生素 D 缺乏性佝偻病(佝偻病)是由于儿童体内维生素 D 不足引起钙、磷代谢紊乱,使儿童正在生长的骨骼在成骨过程中不能正常沉着钙盐而产生的一种以骨骼病变为特征的全身慢性营养性疾病^[1]。营养和环境因素被认为是佝偻病发病的主要决定因素,但遗传因素是否为佝

钙盐而产生的一种以骨骼病变为特征的全身慢性营养性疾病^[1]。营养和环境因素被认为是佝偻病发病的主要决定因素,但遗传因素是否为佝

[收稿日期]2010-01-10;[修回日期]2010-02-08
[基金项目]兰州市科技局科研基金项目资助(2009-1-51)。
[作者简介]弓毅谷,女,硕士研究生。
[通信作者]李宇宁,教授。

佝病的病因之一尚存争议,本研究通过检测维生素 D 受体基因多态性 Fok I 位点与 25-羟维生素 D₃,同时探讨维生素 D 受体基因多态性 Fok I 位点与佝病的相关性。

1 对象和方法

1.1 研究对象

病例组为 2008 年 11 月至 2009 年 4 月就诊于兰州大学第一医院儿科门诊的佝病患儿 62 例,其中男 40 例,女 22 例,年龄为 2~36 月,诊断均符合第 7 版《诸福棠实用儿科学》“维生素 D 缺乏性佝病”的诊断标准^[1]。对照组为同期在本院儿童保健科体检的正常健康儿童 60 例,其中男 36 例,女 24 例,年龄为 2~36 月。研究对象均来自甘肃籍汉族儿童,相互间无血缘关系,排除慢性肝、肾疾病,遗传代谢性疾病,2 周内均未服用维生素 D 制剂。

1.2 研究方法

1.2.1 PCR-RFLP 检测 Fok I 位点 采用 EDTA 抗凝管收集静脉血 2 mL,用人基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工提供)提取 DNA, -20℃ 保存。扩增试剂盒(上海生工提供),引物按文献^[2]设计(上海生工合成),序列为:P1:5'-AGCTGGCCCTGGCACT-GACTGACTCTGCTCT-3', P2:5'-ATGGAAACACCTT-GCTTCTTCTCCCTC-3'。反应总体积 25 μL,其中模板 DNA 2 μL,两端引物各 1 μL, Taq DNA 聚合酶 0.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μL, 2 mmol/L dNTP 1 μL, 10×PCR 缓冲液 2.5 μL, 灭菌双蒸馏水补至 25 μL。反应条件为:94℃ 预变性 4 min 后、进行 30 次循环,每个循环的条件是 94℃ 变性 45 s, 60℃ 复性 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 循环完后 72℃ 延伸 5 min。取 10 μL 扩增产物,加入 Fok I 内切酶(美国 NEB 公司提供)5 U, 37℃ 水浴消化 2 h。酶切产物于含 2% EB 的琼脂糖凝胶上电泳后用凝胶图像分析系统分析基因型。分型标准:FF(267 bp), Ff(267 bp、219 bp、69 bp), ff(219 bp、69 bp)。

1.2.2 血清 25-羟维生素 D₃ 测定 采用干燥促凝管收集静脉血 2 mL, 静置 30 min, 2 000 转离心 10 min, 分离上清液, -80℃ 保存。标本集中用 ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司提供)检测。

1.3 统计学分析

用基因计数法分别统计两组基因型和等位基因的分布频率。数据经 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验后,用 SPSS 11.5 统计软件分析。两组之间的基因

型和等位基因分布频率差异用 χ^2 检验。两组之间血清 25-羟维生素 D₃ 差异用 t 检验。

2 结果

2.1 血清 25-羟维生素 D₃ 水平

病例组血清 25-羟维生素 D₃ 水平(9.1±4.1 ng/mL), 低于对照组(16.2±6.9 ng/mL), 差异有统计学意义($t = -6.696, P < 0.05$)。

2.2 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验

为考察资料的可靠性,在基因计数法计数后按文献^[3]对病例组和对照组维生素 D 受体基因多态性 Fok I 位点基因型分布进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验,结果病例组符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验($\chi^2 = 4.190, P > 0.05$),对照组也符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验($\chi^2 = 0.022, P > 0.05$),说明两组资料的代表性均好。

2.3 维生素 D 受体基因多态性 Fok I 位点基因型酶切鉴定

分型标准:FF(267 bp), Ff(267 bp、219 bp、69 bp), ff(219 bp、69 bp)。见图 1。

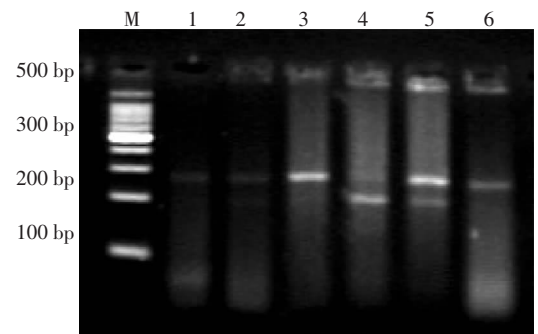


图1 Fok I 酶切结果 M:100 bp, Marker; 1,3:FF 基因型(267 bp); 2,5: Ff 基因型(267 bp、219 bp、69 bp); 4:ff 基因型(219 bp、69 bp); 6:PCR 扩增产物(267 bp)。(注:69 bp 酶切片段过小,电泳图中未出现)。

2.4 病例组与对照组维生素 D 受体基因多态性 Fok I 位点基因型与等位基因分布频率比较

维生素 D 受体基因多态性 Fok I 位点病例组 FF 基因型明显高于对照组(53% vs 25%), 基因型分布频率差异有统计学意义($\chi^2 = 10.221, P < 0.05$),病例组 F 等位基因频率明显高于对照组(73% vs 57%), 等位基因分布频率差异有统计学意义($\chi^2 = 7.511, P < 0.05$)。见表 1。

表1 两组维生素D受体基因型和等位基因分布频率 [例(%)]

例	基因型			等位基因频率		
	FF	Ff	ff	F	f	
对照组	60	15 (25)	38 (63)	7 (12)	68 (57)	52 (43)
病例组	62	33 (53)	25 (40)	4 (6)	91 (73)	33 (27)
χ^2 值				10.221		7.511
P 值				<0.05		<0.05

3 讨论

1~3岁是佝偻病的好发年龄,此年龄阶段男女性别间发病率差异无统计学意义^[4],除地理位置、生活环境、生活方式外,遗传因素可能也起着重要作用。维生素D受体是介导1,25-二羟维生素D₃发挥生物效应的核内生物大分子,属于类固醇激素受体和甲状腺激素受体超家族成员,本质上是一种配体依赖转录因子,其与维甲酸X受体形成异源二聚体,通过与其配体1,25-二羟维生素D₃结合而发挥生物效应^[5]。维生素D受体基因型可以影响人体对所摄入钙和维生素D的转化利用,同时与骨代谢密切相关,可以预测儿童钙吸收率和骨密度水平^[6]。临床治疗中发现部分佝偻病患者维生素D治疗不敏感,提示该病可能有遗传易感性。

本研究发现佝偻病与维生素D受体基因多态性Fok I位点存在相关性,病例组FF基因型及F等位基因频率明显高于对照组,病例组f等位基因频率明显低于对照组,说明维生素D受体基因等位基因F可能增加机体对佝偻病的易感性。

关于维生素D受体基因多态性在维生素D相关性疾病中的作用机制的研究,近年的研究有维生素D受体基因多态性Fok I位点与25-羟维生素D₃水平相关性,其最早被Orton等^[7]在双胎多发性硬化研究中报道,即双胎多发性硬化中维生素D受体基因多态性Fok I位点影响季节性25-羟维生素D₃水平变化。最近Smolders等^[8]在多发性硬化维生素D受体基因多态性Fok I位点与维生素D代谢研究中发现,病例组与对照组携带F等位基因的个体比携带f等位基因的个体25-羟维生素D₃水平低,并且提出维生素D受体基因多态性影响维生素D代谢的模型,即1,25-二羟维生素D₃通过维生素D受体调节它自身水平及其前体水平。不管是否受25-羟维生素D-1 α -羟化酶、1,25-二羟维生素D-24-羟化酶、钙、磷、甲状旁腺激素水平的调节,体内维生素D代谢受维生素D受体基因多态性Fok I位点影响,当体内1,25-二羟维生素D₃水平升高时,其与维生素D受体结合,启动维生素D受体基因Fok I位

点的表达,通过负反馈调节25-羟维生素D 1 α -羟化酶、25-羟化酶的活性,减少维生素D前体转化为25-羟维生素D₃,继而减少1,25-二羟维生素D₃的形成,同时通过正反馈调节1,25-二羟维生素D-24-羟化酶活性,增加1,25-二羟维生素D₃转化为1,24、25-三羟维生素D₃,维持体内维生素D代谢的平衡,当体内1,25-二羟维生素D₃水平减低时也通过此途径调节。维生素D受体基因多态性Fok I通过正、负反馈调节而影响维生素D代谢。

维生素D受体基因多态性与佝偻病存在易感性,国内相关研究提示FF基因型比ff基因型易患佝偻病,F等位基因可能增加机体对佝偻病的易感性^[9-10],本研究结果与上述研究基本一致。冬春季儿童户外活动少,排除外源维生素D的摄入和光照的影响后,血清25-羟维生素D₃水平病例组明显低于对照组,这说明佝偻病的发病可能像多发性硬化一样,维生素D受体基因多态性影响维生素D代谢,从而影响25-羟维生素D₃水平,出现病例组血清25-羟维生素D₃水平比对照组低。而佝偻病中维生素D受体基因多态性与25-羟维生素D₃相关性及其影响维生素D代谢的作用,有待于今后大样本、多中心的深入研究。

[参 考 文 献]

[1] 胡亚美,江载芳. 诸福棠实用儿科学[M]. 第7版. 北京: 人民卫生出版社,2002: 536-542.

[2] 卢娟娟,李宇宁,金玉,李雷. 维生素D受体多态性与晚发性佝偻病易感性研究[J]. 中华儿科杂志,2007,45(1): 46-50.

[3] Motulsky V主编,罗会元主译. 人类遗传学[M]. 第3版. 北京: 人民卫生出版社,1999: 749-750.

[4] 张维华,李宇宁,金玉,周丽,弓毅谷,陶仲宾,等. 维生素D受体基因Fok I、Taq I多态性与女性婴幼儿佝偻病的相关性[J]. 实用儿科临床杂志,2009,24(7): 505-507.

[5] Haussler MR, Haussler CA, Jurutka PW, Thompson PD, Hsieh J-C, Remus LS, et al. The vitamin D hormone and its nuclear receptor: molecular actions and disease states[J]. J Endocrinol, 1997, 154:S57-S73.

[6] 杨建平,席卫平,李连青,朱庆义,周向红. 维生素D受体基因Bsm I多态性与儿童佝偻病的关系研究[J]. 中国实用儿科杂志,2006,21(1): 61-62.

[7] Orton SM, Morris AP, Herrera BM, Ramagopalan SV, Lincoln MR, Chao MJ, et al. Evidence for genetic regulation of vitamin D status in twins with multiple sclerosis[J]. Am J Clin Nutr, 2008, 88(2): 441-447.

[8] Smolders J, Damoiseaux J, Menheere P, Cohen Tervaert JW, Hupperts R. Fok-I vitamin D receptor gene polymorphism (Rs10735810) and vitamin D metabolism in multiple sclerosis[J]. J Neuroimmunol, 2009, 207(1-2): 117-121.

[9] 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.

[10] 吴胜虎,颜崇淮,沈晓明. 维生素D受体基因多态性与佝偻病易感性的研究进展[J]. 中国当代儿科杂志,2006,8(1): 83-85.

(本文编辑:黄 榕)