

论著·临床研究

## 维生素D受体基因多态性与新疆南部地区 维吾尔族儿童尿路结石相关性研究

凯赛尔·阿吉 宋光鲁 安尼瓦尔·牙生 拜合提亚·阿扎提 哈木拉提·吐送

(新疆医科大学第一附属医院泌尿外科,新疆 乌鲁木齐 830011)

**[摘要]** 目的 探讨维生素D受体(VDR)基因多态性与新疆南部地区维吾尔族儿童尿路结石相关性,阐明分子遗传学规律。方法 维吾尔族尿路结石患儿(病例组)74例和维吾尔族正常儿童(对照组)103例纳入此研究,应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析研究VDR基因FokI和ApaI位点多态性与新疆南部地区维吾尔族儿童尿路结石相关性。结果 VDR基因FokI位点FF、Ff、ff 3种基因型在病例组及对照组之间分布差异有统计学意义( $\chi^2 = 7.818, P < 0.05$ ),基因型Ff在病例组占58%,明显高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。VDR基因ApaI位点AA、Aa、aa 3种基因型在病例组和对照组的分布差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 VDR基因FokI位点多态性将来可作为维吾尔族儿童泌尿系结石的候选基因。

[中国当代儿科杂志,2012,14(12):956-959]

**[关键词]** 尿路结石;VDR基因;等位基因多态性;维吾尔族;儿童

**[中图分类号]** R726.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2012)12-0956-04

### Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with urolithiasis in Uyghur children from southern Xinjiang, China

Kaysar Aji, SONG Guang-Lu, Anwar YASEN, Bahtiyar AZAD, Halmurat TURSUN. Department of Urology, First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China (Email: Raysaraji@hotmail.com)

**Abstract: Objective** To investigate the association of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms with urolithiasis in Uyghur children from southern Xinjiang, China, and to clarify the molecular genetic mechanism for the disease. **Methods** Seventy-four Uyghur children with urolithiasis (case group) and 103 healthy Uyghur children (control group) were enrolled as subjects. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism was used to analyze the association of VDR gene FokI and ApaI polymorphisms with urolithiasis in Uyghur children from southern Xinjiang. **Results** There were significant differences in FokI genotypes (FF, Ff and ff) between the case and control groups ( $\chi^2 = 7.818, P < 0.05$ ). The genotype Ff accounted for 58% of all genotypes in the case group, and Ff was significantly more prevalent in the case group than in the control group ( $P < 0.05$ ). There were no significant differences in ApaI genotypes (AA, Aa, and aa) between the case and control groups. **Conclusions** The polymorphisms of VDR gene FokI may be a suitable genetic marker for urolithiasis in Uyghur children. [Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(12):956-959]

**Key words:** Urolithiasis; VDR gene; Polymorphism; Uyghur; Child

尿路结石为泌尿外科常见疾病,由环境因素、代谢异常及遗传因素等引起<sup>[1-2]</sup>。明确引起尿路结石的环境及遗传因素不仅有助于了解其发病发展过程,还可以评价个体存在的危险<sup>[3]</sup>。研究表明,患有遗传性高钙尿性尿路结石大鼠的肠道、骨骼、肾脏中维生素D受体(VDR)基因的数量明显增多<sup>[4-5]</sup>。某些学者提出VDR基因与尿路结石之间可能存在联系<sup>[6-7]</sup>。最近的Meta分析表明,VDR基因等位基

因的变异被看作是尿路结石的病因<sup>[8]</sup>。

维吾尔族主要生活在新疆南部地区,该地区维吾尔族儿童尿路结石患病率比生活在同一个地区的汉族儿童高出很多<sup>[9]</sup>,这说明除了饮食环境因素之外的内部因素在起作用。而目前尚无研究维吾尔族儿童泌尿系结石与基因相关性方面的报道,因此,本研究的目的在于探讨VDR基因FokI、ApaI位点多态性与新疆南部地区维吾尔族儿童尿路结石的相关性。

[收稿日期]2012-06-19;[修回日期]2012-07-21

[作者简介]凯赛尔·阿吉,男,硕士研究生。

[通信作者]安尼瓦尔·牙生,副教授。

# 1 资料与方法

## 1.1 研究对象

2011年3月至2011年12月在我院住院治疗的维吾尔族泌尿系结石患儿共74例为病例组,其中男48例,女26例,年龄6个月至5岁,包括肾结石41例,输尿管结石23例及膀胱结石10例;另取103例正常维吾尔族儿童为对照组,其中男58例,女45例,年龄6个月至7岁。病例组及对照组儿童及父母均出生于新疆南部地区的维吾尔族。诊断标准参考第九版坎贝尔泌尿外科学泌尿系结石诊断标准<sup>[10]</sup>。病例组均为草酸钙结石患儿(结石样本在我院行结石成分分析,草酸钙结石患儿选入此研究)。对照组均行泌尿系B超、病史及家族史确认正常。患有钙磷代谢有关其他疾病者不纳入此研究。本研究获得新疆医科大学第一附属医院伦理委员会的审批及家长书面知情同意。

## 1.2 研究方法

1.2.1 试剂用品 外周血DNA分离试剂盒为Bio Take生物公司产品。PCR Master Mix及FokI、ApaI限制性内切酶为MBI Fermentas公司产品。引物序列采用DNAMAN程序设计,由上海生工生物公司合成。

1.2.2 标本采集及血液基因组DNA的提取 基因组DNA取自两组儿童外周血,采用外周血基因组DNA提取试剂盒分离提取。

1.2.3 PCR扩增目的基因及限制性片段长度多态性分析 VDR基因多态性反应体系总体积为20 mL,包括10 mL PCR Master Mix、上下游引物各30 pmol、0.1~0.5 μg DNA模板。VDR基因FokI酶切片段引物序列为:正向5'-AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT-3';反向5'-ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTC-CCTC-3'。PCR扩增条件为:95℃预变性5 min,95℃变性30 s,60℃退火30 s,72℃延伸30 s,30个循环;72℃再延伸5 min。最后产生265 bp的PCR产物,经2%琼脂糖凝胶电泳鉴定。PCR产物加1单位FokI内切酶在37℃过夜进行内切,再经2%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

VDR基因ApaI酶切片段引物序列为:正向5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAA-3';反向5'-GCAACTCCTCATGGCTGAGGTCTC-3'。PCR扩增条件为:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,63.5℃退火30 s,72℃延伸45 s,30个循环;72℃再延伸5 min。产生740 bp大小的PCR产物,经2%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

PCR产物加2单位ApaI内切酶在37℃过夜进行内切后,经3%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.4 酶切结果鉴定 目的片段经相应内切酶内切以后电泳条带会出现3种情况:没有内切位点的纯合子出现1个条带,用FF/AA表示;有内切位点的纯合子出现两个条带,用ff/aa表示;杂合子出现3个条带,用Ff/Aa表示。

## 1.3 统计学分析

采用SPSS 18.0软件对数据进行统计学分析,所有数据进行Hardy-Weinberg平衡检验。病例组与对照组之间基因型分布差异用 $\chi^2$ 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

# 2 结果

Hardy-Weinberg平衡检验结果显示等位基因期望值和观察值相吻合,即均符合Hardy-Weinberg平衡,说明资料可靠,代表性好。

两组儿童中不同基因型经FokI、ApaI限制性内切酶酶切后出现的条带数目及位置见图1~2。

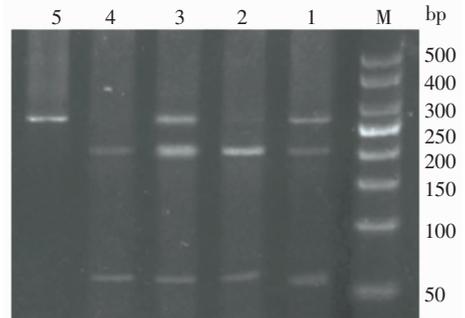


图1 FokI酶切后出现的条带数目及位置 M: Marker (500 bp);第1,3泳道为Ff基因型,酶切后出现265、196、69 bp 3条条带;第2,4泳道为ff基因型,酶切后出现196、69 bp 两条条带;第5泳道为FF基因型,酶切后仅出现265 bp 1条条带。

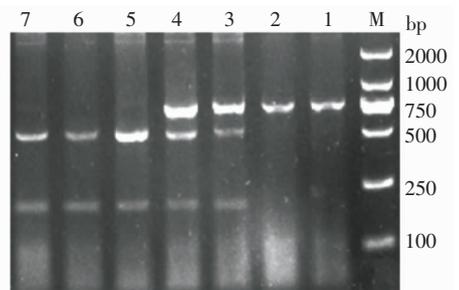


图2 ApaI酶切后出现的条带数目及位置 M: Marker (2000 bp);第1,2泳道为AA基因型,酶切后仅出现740 bp 1条条带;第3,4泳道为Aa基因型,酶切后出现740、515、225 bp 3条条带;第5~7泳道为aa基因型,酶切后出现515、225 bp 两条条带。

VDR 基因 FokI 位点基因多态性在病例组及对照组之间分布差异有统计学意义( $\chi^2 = 7.818, P < 0.05$ ),其中基因型 Ff 在病例组占 58%,明显高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1。病例组与对照组男女之间 FokI 位点基因型分布无明显差异( $P > 0.05$ ),见表 2。

ApaI 位点基因型分布在病例组及对照组之间差异无统计学意义;且基因型分布在病例组中存在性别差异( $P < 0.05$ )。见表 3~4。

表 1 FokI 位点基因型组间分布 [例(%)]

组别	例数	FF	Ff	ff	$\chi^2$ 值	P 值
对照组	103	33(32)	39(38)	31(30)	7.818	0.02
病例组	74	19(26)	43(58)	12(16)		

表 2 FokI 位点基因型在两组的性别分布 [例(%)]

组别	例数	FF	Ff	ff	$\chi^2$ 值	P 值
对照组					2.247	0.325
男性	58	20(34)	24(41)	14(24)		
女性	45	13(29)	15(33)	17(38)		
病例组					0.347	0.892
男性	48	12(25)	29(60)	7(15)		
女性	26	7(27)	14(54)	5(19)		

表 3 ApaI 位点基因型组间分布 [例(%)]

组别	例数	AA	Aa	aa	$\chi^2$	P 值
对照组	103	32(31)	42(41)	29(28)	0.394	0.821
病例组	74	21(28)	29(39)	24(32)		

表 4 ApaI 位点基因型在两组的性别分布 [例(%)]

组别	例数	AA	Aa	aa	$\chi^2$	P 值
对照组					0.449	0.779
男性	58	19(33)	22(38)	17(29)		
女性	45	13(29)	20(44)	17(27)		
病例组					6.270	0.044
男性	48	9(19)	21(44)	18(37)		
女性	26	12(46)	8(31)	6(23)		

### 3 讨论

维吾尔族主要集中在新疆南部地区,生活习惯及饮食习惯基本相同,而新疆南部各个地区的气候环境也基本相同。为了避免饮食环境因素对结果的影响,本研究选择的对象均来自于新疆南部地区的维吾尔族儿童,将其余因素降低至最低水平。

尿路结石是由多种原因引起的复杂性疾病,不同基因可能影响疾病发生的不同环节。VDR 可调节细胞增殖、分化及肠道中钙的吸收,甚至影响着雄激素及雌激素的活性<sup>[11]</sup>。维生素 D 受体不仅受

VDR 基因的调节,还受到蛋白酶 A,甲状旁腺激素及生长因子的调节。VDR 的任何缺陷通过影响钙的吸收而增加某些疾病的发生,如骨质疏松、草酸钙结石、前列腺癌等。

VDR 基因多态性被看作是钙代谢有关疾病的基因标记。多个研究显示 VDR 基因多态性与尿路结石有显著相关性。Bid 等<sup>[12]</sup>对 60 例正常儿童及 50 例尿路结石儿童进行病例对照研究,结果显示 VDR 基因 FokI 位点多态性与儿童尿路结石有相关性。Chen 等<sup>[13]</sup>对 146 例草酸钙结石患者进行 VDR 基因多态性分析,发现 VDR 基因中 F 等位基因携带者患草酸钙结石的危险性是 f 等位基因携带者的 1.67 倍。Wang 等<sup>[14]</sup>将 464 例汉族尿路结石患者及 450 例年龄及性别匹配的健康人群进行了病例对照研究,结果显示 VDR 基因 FokI、ApaI 位点基因型分布在病例组及对照组之间有差异( $P = 0.001$ ),在男性当中 Aa 及 aa 基因型增加患尿路结石的风险分别为 3 倍及 2.1 倍。Bid 等<sup>[15]</sup>对 138 例草酸钙尿路结石患者及 166 例正常人群进行的研究发现 VDR 基因 FokI 位点多态性与泌尿系结石显著相关( $\chi^2 = 22.086, P < 0.001$ ),而基因型分布在男女性别之间也存在明显差异( $\chi^2 = 22.381, P < 0.001$ )。本研究结果亦显示 VDR 基因 FokI 位点基因型分布在病例组及对照组间差异有统计学意义,但本研究结果未显示基因型分布与性别之间的统计学差异。VDR 基因型频率及分布可能因不同的种族、不同的民族而有所不同。

Ozkaya 等<sup>[3]</sup>研究报告显示 ApaI 位点 AA 基因型在草酸钙肾结石儿童中出现的频率明显高于对照组,但本研究发现 VDR 基因 ApaI 位点基因型分布在两组间差异无统计学意义。与 Gunes 等<sup>[16]</sup>研究结果相似,这些不同的结果可能是由种族及地理环境的不同引起。

综上,本研究发现 VDR 基因多态性与新疆南部维吾尔族儿童尿路结石有相关性,VDR 基因 FokI 多态性可能成为将来尿路结石病因研究中的基因标记。然而,目前众多的尿路结石与基因多态性相关性研究当中,几乎都不能确切地肯定两者之间的相关性。因此,将来还需要做进一步研究,扩大样本含量,找出新的基因与新的位点确定及发现更多的、更好的尿路结石的候选基因。

志谢:非常感谢新疆医科大学第一附属医院泌尿系外科安尼瓦尔教授、王玉杰教授的细心指导以及科技楼分子生物学实验室提供的实验环境及指导。

[参 考 文 献]

- [1] Worcester EM, Coe FL. Clinical practice. Calcium kidney stones [J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(10): 954-963.
- [2] Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases[J]. *Clin Chim Acta*, 2006, 371(1-2): 1-12.
- [3] Ozkaya O, Söylemezoglu O, Misirlioglu M, Gönen S, Buyan N, Hasanoglu E. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and the risk of calcium nephrolithiasis in children [J]. *Eur Urol*, 2003, 44(1): 150-154.
- [4] Bushinsky DA, Frick KK, Nehrke K. Genetic hypercalciuric stone-forming rats [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2006, 15(4): 403-418.
- [5] Karnauskas AJ, van Leeuwen JP, van den Bemd GJ, Kathalia PP, DeLuca HF, Bushinsky DA, et al. Mechanism and function of high vitamin D receptor levels in genetic hypercalciuric stone-forming rats [J]. *J Bone Mineral Res*, 2005, 20(3): 447-454.
- [6] Mossetti G, Vuotto P, Rendina D, Numis FG, Viceconti R, Giordano F, et al. Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and tubular citrate handling in calcium nephrolithiasis [J]. *Intern Med*, 2003, 253(2): 194-200.
- [7] Mossetti G, Rendina D, Viceconti R, Manno G, Guadagno V, Strazzullo P, et al. The relationship of 3' vitamin D receptor haplotypes to urinary supersaturation of calcium oxalate salts and to age at onset and familial prevalence of nephrolithiasis [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2004, 19(9): 2259-2265.
- [8] Lin Y, Mao Q, Zheng X, Chen H, Yang K, Xie L, et al. Vitamin D receptor genetic polymorphisms and the risk of urolithiasis: a meta-analysis [J]. *Urol Int*, 2011, 86(3): 249-255.
- [9] 木拉提·马合木提, 阿里木·太来提, 安尼瓦尔·牙生. 儿童尿路结石 286 例临床分析 [J]. *临床泌尿外科杂志*, 2007, 22(4): 280-282.
- [10] 魏恩. 泌尿系结石的评估和治疗 [M] // 郭应禄, 周利群 (译). 坎贝尔泌尿外科学. 第九版. 北京: 北京大学医学出版社, 2009: 1479-1487.
- [11] Bid HK, Mishra DK, Mittal RD. Vitamin-D receptor (VDR) gene (Fok-I, Taq-I and Apa-I) polymorphisms in healthy individuals from north indian population [J]. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 2005, 6(2): 147-152.
- [12] Bid HK, Chaudhary H, Mittal RD. Association of vitamin-D and calcitonin receptor gene polymorphism in paediatric nephrolithiasis [J]. *Pediatr Nephrol*, 2005, 20(6): 773-776.
- [13] Chen WC, Chen HY, Lu HF, Hsu CD, Tsai FJ. Association of the vitamin D receptor gene start codon FokI polymorphism with calcium oxalate stone disease [J]. *BJU Int*, 2001, 87(3): 168-171.
- [14] Wang S, Wang X, Wu J, Lin Y, Chen H, Zheng X, et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphism and calcium urolithiasis in the Chinese Han population [J]. *Urol Res*, 2012, 40(4): 277-284.
- [15] Bid HK, Kumar A, Kapoor R, Mittal RD. Association of vitamin D receptor-gene (FokI) polymorphism with calcium oxalate nephrolithiasis [J]. *J Endourol*, 2005, 19(1): 111-115.
- [16] Gunes S, Bilen CY, Kara N, Asci R, Bageci H, Yilmaz AF. Vitamin D receptor gene polymorphisms in patients with urolithiasis [J]. *Urol Res*, 2006, 34(1): 47-52.

(本文编辑: 王庆红)