

DOI:10.7499/j.issn.1008-8830.2013.11.019

论著·临床研究

## DNA 测序研究维生素 D 受体基因多态性与 儿童克罗恩病相关性

罗优优 舒小莉 赵泓 余金丹 马鸣 陈洁

(浙江大学医学院附属儿童医院消化科, 浙江 杭州 310003)

**[摘要]** **目的** 初步探讨维生素 D 受体基因多态性 TaqI、BsmI、ApaI 位点在儿童克罗恩病 (CD) 发病中的作用。**方法** 选取 19 例 CD 患儿为病例组, 122 例正常健康体检儿童为对照组。ELISA 方法检测血清 25 羟维生素 D<sub>3</sub> [25(OH)D<sub>3</sub>] 水平; 基因测序方法检测两组维生素 D 受体基因多态性 TaqI、BsmI、ApaI 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(OH)D<sub>3</sub> 水平 (17.3 ± 2.4 ng/mL) 较对照组 (26.9 ± 2.1 ng/mL) 明显降低, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。TaqI、BsmI、ApaI 3 个位点基因型及等位基因型在病例组和对照组间的分布差异无统计学意义 (P > 0.05)。**结论** CD 患儿存在低 25(OH)D<sub>3</sub> 水平; 维生素 D 受体基因多态性 TaqI、BsmI、ApaI 位点与 CD 的发生无关。 [中国当代儿科杂志, 2013, 15(11): 1006-1008]

**[关键词]** 克罗恩病; 维生素 D 受体; 25 羟维生素 D; 基因多态性; 儿童

### Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and pediatric Crohn's disease in China: a study based on gene sequencing

LUO You-You, SHU Xiao-Li, ZHAO Hong, YU Jin-Dan, MA Ming, CHEN Jie. Department of Gastroenterology, Children's Hospital of Zhejiang University, School of Medicine, Hangzhou 310003, China (Chen J, Email: hzcjie@zju.edu.cn)

**Abstract: Objective** To investigate the association between TaqI, BsmI, and ApaI polymorphisms of vitamin D receptor (VDR) gene and pediatric Crohn's disease (CD) in China. **Methods** Nineteen children with CD were selected as a case group, and 122 healthy children who underwent physical examination were selected as a control group. Serum 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> [25(OH)D<sub>3</sub>] levels were measured using ELISA. The TaqI, BsmI, and ApaI polymorphisms of VDR gene were determined by gene sequencing, and the two groups were compared in terms of genotype and allele frequencies. **Results** The case group had significantly lower serum 25(OH)D<sub>3</sub> levels than the control group (17.3 ± 2.4 ng/mL vs 26.9 ± 2.1 ng/mL; P < 0.05). There were no significant differences in the frequencies of genotypes and alleles of TaqI, BsmI, and ApaI polymorphisms between the case and control groups (P > 0.05). **Conclusions** Children with CD have low serum 25(OH)D<sub>3</sub> levels. TaqI, BsmI, and ApaI polymorphisms of VDR gene may not be associated with susceptibility to CD among the Chinese population. [Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(11): 1006-1008]

**Key words:** Crohn's disease; Vitamin D receptor; 25-hydroxyvitamin D; Gene polymorphism; Child

克罗恩病 (CD) 是炎症性肠病 (IBD) 的一种类型, 其发病机制尚不明确, 目前认为与遗传、环境及免疫相关。近年研究发现活化的维生素 D 可以协同固有免疫及适应性免疫, 调控炎症反应, 并改善肠屏障完整性<sup>[1]</sup>。欧美文献报道 IBD 患者存在维生素 D 水平降低<sup>[2-3]</sup>, 但维生素 D 水平的下降是引起 IBD 的原因, 还是 IBD 导致的结果, 目

前仍是学术讨论的热点。维生素 D 受体 (VDR) 基因敲除大鼠可发生结肠炎症性改变<sup>[4]</sup>, 提示维生素 D 可能在 IBD 的发病中起重要作用。在中国尚未见维生素 D 与 IBD 相关的文献。本研究通过前瞻性检测 CD 患儿的血清维生素 D 水平, VDR 基因 TaqI、BsmI、ApaI 位点多态性, 分析其与 CD 相关性, 并探讨维生素 D 在 CD 发病机制中的作用。

[收稿日期] 2013-04-10; [修回日期] 2013-05-19

[项目基金] 世界健康基金会资助项目 (H20112392); 浙江省教育厅科研资助项目 (Y201226163)。

[作者简介] 罗优优, 女, 硕士, 主治医师。

[通信作者] 陈洁, 主任医师。

# 1 资料与方法

## 1.1 研究对象

选取2011年5月至2013年1月在浙江大学医学院就诊的CD患儿19例为病例组，其中男10例，女9例，年龄5~17岁，平均年龄 $12.7 \pm 2.8$ 岁，诊断均符合2012年中华医学会消化病学分会制定的CD诊断标准<sup>[5]</sup>；病变部位依据参考文献<sup>[6]</sup>分型，19例患儿中，小肠结肠型CD患儿15例，小肠型CD患儿3例，结肠型CD患儿1例。对照组为同期在本院儿童保健科体检的正常健康儿童122例，其中男64例，女58例，年龄3~16岁，平均年龄 $13.6 \pm 2.4$ 岁。

## 1.2 方法

1.2.1 血清25羟维生素D测定 采集两组儿童静脉血2 mL于干燥促凝试管，室温静置30 min，3000 r/min离心10 min，分离上清液，-80℃保存。标本用ELISA试剂盒（美国R&D公司提供）检测25羟维生素D<sub>3</sub>[25(OH)D<sub>3</sub>]水平。

1.2.2 基因测序法检测TaqI、BsmI、ApaI位点 采集所有受检对象静脉血2 mL，EDTA抗凝处理，用人基因组DNA抽提试剂盒（美国Axygen公司）提取DNA，-20℃保存备用。采用扩增试剂盒（上海Invitrogen公司提供）对目的基因进行扩增。引物按文献设计（上海Invitrogen公司合成）<sup>[7]</sup>，序列为：TaqI上游引物：5'-AATGCACGGAGAAGTCACTG-3'，下游引物：5'-ATCTTGGCATAGAGCAGGTG-3'，片段长度为20 bp；BsmI、ApaI上游引物：5'-TCTAACCAGCGG-AAGAGGTC-3'，下游引物：5'-GTGTGGACGCTGA-GGTGCC-3'，片段长度为20 bp。反应总体积25 μL，其中10×PCR缓冲液2.5 μL，2.5 mM dNTP混合液2.5 μL，50 mM MgCl<sub>2</sub> 0.75 μL，上下游引物（5 μM）各1 μL，模板1 μL，Platinum Taq DNA聚合酶0.2 μL，灭菌蒸馏水16.05 μL。PCR反应条件：94℃预变性5 min；94℃变性30 s，55℃退火30 s，72℃延伸1 min，循环35次；72℃终末延伸5 min，4℃保持。PCR完毕后，行1.5%的琼脂糖凝胶电泳，使用3730XL型DNA测序仪进行测序。

## 1.3 统计学分析

应用SPSS 17.0统计软件对数据进行统计学分析，计量资料采用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，两组间比较采用t检验；基因计数法统计两组基因型和等位基因的分布频率，对研究对象进行Hardy-Weinberg遗传平衡分析，组间基因型频率分析采用 $\chi^2$ 检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

# 2 结果

## 2.1 血清25(OH)D<sub>3</sub>水平

病例组中，15例小肠结肠型CD患儿的平均25(OH)D<sub>3</sub>水平为 $17.3 \pm 2.4$  ng/mL，3例小肠型患儿的25(OH)D<sub>3</sub>水平为 $16.1 \pm 4.2$  ng/mL，1例结肠型患儿的25(OH)D<sub>3</sub>水平为14.7 ng/mL。63% (12/19)的患儿存在维生素D不足 ( $\leq 20$  ng/mL)，26% (5/19)的患儿存在维生素D缺乏 ( $\leq 15$  ng/mL)，仅11% (2/19)的患儿维生素D水平正常；其中5例维生素D缺乏的患儿病程 ( $1.04 \pm 0.94$ 年) 长于2例维生素D正常患儿 ( $0.63 \pm 0.18$ 年)，CD活动指数(PCDAI,  $29 \pm 10$ ) 高于维生素D正常患儿 ( $22 \pm 4$ )，而白蛋白水平 ( $31 \pm 5$  g/L) 则低于维生素D正常患儿 ( $33 \pm 5$  g/L)，但由于两组患儿例数偏少，未行统计学比较分析。所有对照组儿童的维生素D水平均正常。病例组血清25(OH)D<sub>3</sub>水平 ( $17.3 \pm 2.4$  ng/mL) 较对照组 ( $26.9 \pm 2.1$  ng/mL) 明显降低，差异有统计学意义 ( $t = -18.28, P < 0.05$ )。

## 2.2 SNP位点与CD关系

病例组中，2例 (67%) 小肠型患儿及1例 (100%) 结肠型患儿在ApaI (rs7975232) 位点为AC基因型，在小肠结肠型患儿中，仅4例 (27%) 患儿在此位点存在AC基因型，但差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 3.398, P > 0.05$ )。病例组中在TaqI (rs731236) 位点只有1例患儿为TC基因型，为小肠结肠型患儿。所有病例组患儿在BsmI (rs1544410) 位点均为GG基因型。本组资料中，TaqI、BsmI、ApaI三个位点基因型及等位基因频率在病例组和对照组间的差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表1。

表1 两组基因型及等位基因频率比较 [例 (%)]

组别	例数	ApaI 基因型			ApaI 等位基因		TaqI 基因型			TaqI 等位基因	
		AA	CC	AC	A	C	TT	CC	TC	T	C
对照组	122	68(55.7)	15(12.3)	39(32.0)	175(71.7)	69(28.3)	110(90.2)	1(0.8)	11(9.0)	231(94.7)	13(5.3)
病例组	19	12(63.2)	0(0)	7(36.8)	31(81.6)	7(18.4)	18(94.7)	0(0)	1(5.3)	37(97.4)	1(2.6)
$\chi^2$ 值		0.369	2.614	0.178	1.623		0.411	0.157	0.297	0.507	
P 值		0.544	0.133	0.673	0.203		0.696	1.000	0.704	0.701	

续表 1

组别	例数	BsmI 基因型			BsmI 等位基因	
		GG	AA	GA	G	A
对照组	122	111(91.0)	3(2.5)	8(6.6)	230(94.3)	14(5.7)
病例组	19	19(100)	0(0)	0(0)	38(100)	0(0)
$\chi^2$ 值		1.858	0.477	1.321	2.294	
P 值		0.360	1.000	0.380	0.228	

### 3 讨论

维生素 D 的活性形式是 1, 25 羟维生素 D<sub>3</sub>, 后者由 25(OH)D<sub>3</sub> 在 1-羟化酶的作用下生成。25(OH)D<sub>3</sub> 较稳定, 可以反映机体维生素 D 的水平。维生素 D 可调整固有免疫、适应性免疫平衡, 通过与高亲和力的特异性受体 VDR 结合而调节有关基因表达, 达到调节机体免疫功能的生物学效应。

本研究中, 病例组患儿 25(OH)D<sub>3</sub> 水平较对照组显著降低, 89%CD 患儿存在 25(OH)D<sub>3</sub> 下降, 提示在中国 CD 患儿中存在显著维生素 D 不足现象。维生素 D 缺乏的 CD 患儿有病程长、低白蛋白水平及高 PDAI 的特点, 分析其原因, 有两种可能:

(1) 维生素 D 可改善肠屏障完整性, 调节免疫应答, 在维生素 D 缺乏的患儿中, 肠屏障功能低下, 免疫应答异常, 从而导致 CD 疾病活动度增高。美国一组前瞻性队列研究发现高维生素 D 水平能显著降低 CD 的发病率, 提示低维生素 D 水平可能与 CD 的发病有关<sup>[8]</sup>; (2) CD 患儿摄入不足致营养不良, 炎症、肠道黏膜功能异常导致吸收不良, 腹泻致维生素 D 在肠道丢失, 病变肠段的手术切除, 户外活动减少, 激素应用等, 均可致血液中维生素 D 水平下降。文献报道 IBD 患儿普遍存在维生素 D 缺乏<sup>[9]</sup>, 与本研究结果的趋势一致。

维生素 D 水平的下降是 CD 发病的原因还是 CD 导致的结果, 目前尚无定论。遗传学研究提示 VDR 基因多态性与 CD 易感性存在相关性。一项 Meta 分析发现, 在欧美人群中, TaqI TT 基因型携带者患 CD 风险增加, 而 ApaI 的 A 等位基因携带者患 CD 风险下降<sup>[10]</sup>。体外试验发现 TT 基因型可能使 VDR mRNA 产生增多, 从而使细胞介导的免疫应答以及单核细胞的活性增加, 导致 CD 炎症进展<sup>[7]</sup>。Dresner 等<sup>[11]</sup>报道犹太溃疡性结肠炎 (UC) 患者“BB”基因型频率较正常犹太人群高, 提示在以色列犹太人群中 BsmI VDR 基因多态性与 UC 的易感性有关。亦有 VDR 基因多态性与 CD 易感性无关的报道: Hughes 等<sup>[12]</sup>对 660 位 IBD 患者及 699 位健康人群行对照研究, 发现在爱尔兰人

群中, TaqI、BsmI、ApaI 三个位点 SNPs 基因型及等位基因与 IBD 易感性无相关性。本研究发现 TaqI、BsmI、ApaI 三个位点 SNPs 基因型及等位基因与 CD 易感性无相关性, 提示在中国汉族人群中, TaqI、BsmI、ApaI 三个位点 SNPs 基因型及等位基因与 CD 易感性可能无关。基于本研究中样本量少, 尚需进一步扩大样本量来验证。

#### [参 考 文 献]

- Palmer MT, Weaver CT. Linking vitamin D deficiency to inflammatory bowel disease[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2013, 19(10): 2245-2256.
- Ulitsky A, Ananthakrishnan AN, Naik A, Skaros S, Zadornova Y, Binion DG, et al. Vitamin D deficiency in patients with inflammatory bowel disease: association with disease activity and quality of life[J]. *J Parenter Nutr*, 2011, 35(3): 308-316.
- Levin AD, Wadhwa V, Leach ST, Woodhead HJ, Lemberg DA, Mendoza-Cruz AC, et al. Vitamin D deficiency in children with inflammatory bowel disease[J]. *Dig Dis Sci*, 2011, 56(3): 830-836.
- Froicu M, Weaver V, Wynn TA, McDowell MA, Welsh JE, Cantorna MT. A crucial role for the vitamin D receptor in experimental inflammatory bowel diseases[J]. *Mol Endocrinol*, 2003, 17(12): 2386-2392.
- 中华医学会消化病学分会炎症性肠病学组. 炎症性肠病诊断与治疗的共识意见 (2012 年, 广州) [J]. *中华内科杂志*, 2012, 51(10): 818-831.
- Levine A, Griffiths A, Markowitz J, Wilson DC, Turner D, Russell RK, et al. Pediatric modification of the Montreal classification for inflammatory bowel disease: the Paris classification[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2011, 17(6): 1314-1321.
- Simmons JD, Mullighan C, Welsh KI, Jewell DP. Vitamin D receptor gene polymorphism: association with Crohn's disease susceptibility[J]. *Gut*, 2000, 47(2): 211-214.
- Ananthakrishnan AN, Khalili H, Higuchi LM, Bao Y, Korzenik JR, Giovannucci EL, et al. Higher predicted vitamin D status is associated with reduced risk of Crohn's disease[J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(3): 482-489.
- Pappa HM, Grand RJ, Gordon CM. Report on the Vitamin D status of adult and pediatric patients with inflammatory bowel disease and its significance for bone health and disease[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2006, 12(12): 1162-1174.
- Xue LN, Xu KQ, Zhang W, Wang Q, Wu J, Wang XY. Associations between vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease: a meta-analysis[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2013, 19(1): 54-60.
- Dresner PR, Ackerman Z, Eliakim R, Karban A, Chowers Y, Fidler HH. The Bsm I vitamin D receptor gene polymorphism is associated with ulcerative colitis in Jewish Ashkenazi patients[J]. *Genet Test*, 2004, 8(4): 417-420.
- Hughes DJ, McManus R, Neary P, O'morain C, O'sullivan M. Common variation in the vitamin D receptor gene and risk of inflammatory bowel disease in an Irish case-control study[J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 23(9): 807-812.

( 本文编辑: 万静 )