

• 基础实验研究论著 •

维生素 D 受体基因 BsmI 多态性与强直性脊柱炎的相关性研究*

廖涛¹, 汪光蓉¹, 邢艳¹, 蒋红², 赵明才^{1,2Δ}

(1. 川北医学院附属医院检验科, 四川南充 637000; 2. 川北医学院风湿免疫研究所, 四川南充 637000)

摘要:目的 探讨维生素 D 受体基因 BsmI 多态性与强直性脊柱炎的关系。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 107 例强直性脊柱炎患者(AS 组)和 166 例健康体检者(对照组)维生素 D 受体 BsmI 基因型和等位基因的分布频率。结果 维生素 D 受体 BsmI 基因型 Bb 和 bb 在 AS 组中的分布频率分别为 22.4% 和 77.6%,在对照组中分别为 7.8% 和 92.2%,两组之间的基因型频率分布有显著性差异($\chi^2 = 11.83, P < 0.05$),AS 组与对照组均未检测到 BB 基因型;等位基因 B 和 b 的分布频率在 AS 组中分别为 11.2% 和 88.8%,在对照组分别为 3.9% 和 96.1%,两者比较差异有统计学意义($\chi^2 = 10.97, P < 0.05$)。结论 维生素 D 受体 BsmI 基因多态性与 AS 有一定的相关性,Bb 基因型可能增加 AS 的易感性。

关键词:强直性脊柱炎; 维生素 D 受体; BsmI; 基因多态性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.22.006

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)22-2956-03

Relationship between vitamin D receptor gene BsmI polymorphism and ankylosing spondylitis*

Liao Tao¹, Wang Guangrong¹, Xing Yan¹, Jiang Hong², Zhao Mingcai^{1,2Δ}

(1. Department of Clinical Laboratory of Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China; 2. Institute of Rheumatology and Immunology of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan, 637000, China)

Abstract: Objective To investigate the association between vitamin D receptor(VDR) gene BsmI polymorphism and ankylosing spondylitis(AS) in Chinese Han patients. **Methods** Genomic DNA from 107 Chinese AS patients and 166 sex and ethnically matched controls were typed for VDR BsmI polymorphism by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). **Results** The VDR BsmI genotypes in the AS patients consisted of heterozygote Bb(22.4%) and homozygote bb(77.6%), while the VDR BsmI genotype in the controls were composed of heterozygote Bb(7.8%) and homozygote bb(92.2%). Significant difference was found in the distribution of VDR BsmI genotype between these two groups($\chi^2 = 11.83, P < 0.05$). There was no BB genotype in both groups. The frequencies of VDR BsmI allele B and b in AS patients were 11.2% and 88.8%, while they were 3.9% and 96.1% in the controls. The frequency of VDR BsmI allele in AS patients was significantly increased, compared with that in controls($\chi^2 = 10.97, P < 0.05$). **Conclusion** There is an association between the VDR gene BsmI polymorphism and the susceptibility to ankylosing spondylitis in Chinese Han population, and Bb genotypes increase the susceptibility to ankylosing spondylitis.

Key words: ankylosing spondylitis; vitamin D receptor; BsmI; gene polymorphism

强直性脊柱炎(AS)的病因目前尚不明确,近年研究表明遗传因素在本病的发病中发挥重要作用,已有研究证实 AS 的发病与 HLA-B27 密切相关,90% 以上的 AS 患者 HLA-B27 阳性,并呈现出明显的家族聚集性。但另一方面,HLA-B27 阳性人群中只有 1%~5% 发展为 AS,这表明 HLA-B27 并不是 AS 易感的惟一因素。近年来,国内外学者对 HLA-B27 以外的基因,如 IL1A/B、IL1RN、IL10、ANKH、NPPS 及 MSX2 等与 AS 的相关性进行了研究^[1]。然而,这些基因在 AS 中的意义尚不明确,其中的大多数相关性研究结果尚未在其他人群,特别是在不同种族中得到证实。

AS 患者常伴骨量减少及椎骨骨质疏松,有些可引起脊柱畸形和骨痛,严重影响患者的生活质量。根据 WHO 的标准,50% 以上的 AS 患者伴有腰椎骨质疏松。因此,与骨量减少或骨质疏松相关的基因可能是 AS 易感的最佳候选基因。维生素 D 受体(VDR)基因多态性与骨质疏松的相关性目前广为国际关注^[2-3],多数研究表明 VDR 基因多态性与骨密度、骨质疏松明显相关,但不同人群的研究结果不尽相同。本文为了探讨 VDR 基因多态性与 AS 的相关性,采用聚合酶链反应-限制性

片段长度多态性(PCR-RFLP)方法对四川汉族人群 AS 患者进行 VDR 基因 BsmI 多态性检测分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 AS 组为 2005 年 12 月至 2008 年 5 月期间来自本院风湿血液门诊及住院部的 107 例 AS 患者,其中男 92 例,女 15 例;年龄 16~60 岁,平均年龄 33 岁。AS 患者符合 1984 年纽约修订 AS 诊断标准。对照组 166 例系性别及年龄与 AS 组匹配的健康人,无血缘关系。

1.2 仪器与试剂 全血基因组 DNA 提取试剂盒、PCR 扩增所用试剂、DNA 标记物(DL2000)购自博瑞克生物技术有限公司;限制性内切酶 BsmI 购自立陶宛 MBI 公司;Hybaid PX2 型 PCR 仪、PowerPacTMHC 型电泳仪、Gel Doc 2000 型凝胶成像仪均为伯乐科技有限公司产品。

1.3 方法

1.3.1 外周血基因组 DNA 提取 EDTA 抗凝静脉血液 2 mL,按照全血基因组 DNA 提取试剂盒说明书操作。

1.3.2 VDR 基因的 PCR 扩增 引物参照文献设计,由北京华大中生科技发展有限公司合成,序列为:上游引物(P1)5'-

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30972749);四川省卫生厅课题资助项目(080097)。 作者简介:廖涛,女,副教授,主要从事感染性疾病研究。 Δ 通讯作者,E-mail:aroge@sohu.com。

CAA CCA AGA CTA CAA GTA CCG CGT CAG TGA-3';下游引物(P2)5'-AAC CAG CGG GAA GAG GTC AAG GG-3'。PCR 扩增反应总体积 50 μ L,包括模板 DNA 5 μ L,引物 P1(20 pmol/ μ L)、P2(20 pmol/ μ L)各 1 μ L,dNTP(2.5 mmol/L)4 μ L,MgCl₂(2.5 mmol/L)2 μ L,10 \times PCR 缓冲液 5 μ L,2.5 U Taq DNA 聚合酶,加 DH₂O 至 50 μ L。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 50 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 PCR 扩增产物在 1%琼脂糖凝胶中进行电泳,凝胶成像仪下观察结果并照相保存图象。

1.3.3 限制性内切酶 BsmI 酶切检测 VDR 基因型 取 PCR 扩增产物 6 μ L,加入 5 U BsmI 酶,10 \times 缓冲液 2 μ L,加 DH₂O 至 20 μ L,37 $^{\circ}$ C 水浴过夜(约 15 h),65 $^{\circ}$ C、15 min 终止酶切反应。取酶切产物在 1.5%琼脂糖凝胶中进行电泳,凝胶成像仪下观察结果并照相保存图象。其中缺乏内切酶 BsmI 酶切位点用 B 表示,存在酶切位点用 b 表示。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行统计学分析,计数资料采用 χ^2 检验,计量资料采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结 果

2.1 VDR 基因 PCR 扩增结果 以外周血基因组 DNA 为模板,用合成的引物进行 VDR 基因 PCR 扩增,1%琼脂糖凝胶电泳显示扩增出约 825 bp DNA 片段,与预期的碱基大小一致,而阴性对照未扩增出条带,见图 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.2 PCR 产物 BsmI 酶切结果 经限制性内切酶 BsmI 对 PCR 产物消化后电泳发现 VDR 基因存在多态性。VDR 基因有 2 个等位基因 B 和 b,可组合形成 BB、Bb 和 bb 基因型。b 表示存在 BsmI 酶切位点,B 表示缺乏 BsmI 酶切位点。因此缺乏酶切位点的 BB 基因型只有 1 条带(825 bp),存在酶切位点的 bb 基因型有 2 条带(650、175 bp),杂合子 Bb 基因型有上述 3 条带(825、650、175 bp),本次研究人群中未检出 BB 基因型,见图 2(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.3 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验 应用 Hardy-Weinberg 遗传平衡吻合度检验方法,对 AS 组和对照组的 VDR 基因型分布进行 Hardy-Weinberg 平衡检验。结果 AS 组和对照组的基因型分布均符合遗传平衡定律($\chi^2 = 1.52, \chi^2 = 0.26, P > 0.05$),说明所选样本人群的代表性好,见表 1。

表 1 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验

| 基因型 | AS 组 | | 对照组 | |
|-----|------|-------|-----|--------|
| | 观察数 | 预期值 | 观察数 | 预期值 |
| BB | 0 | 1.35 | 0 | 0.25 |
| Bb | 24 | 21.28 | 13 | 12.45 |
| bb | 83 | 84.37 | 153 | 153.30 |

2.4 AS 患者和正常人 VDR BsmI 基因检测结果 维生素 D 受体 BsmI 基因型 Bb 和 bb 在 AS 组中的分布频率分别为 22.4%(24/107)和 77.6%(83/107),在对照组中分别为 7.8%(13/166)和 92.2%(153/166),2 组之间的基因型频率分布经 χ^2 检验,差异有统计学意义($\chi^2 = 11.20, P < 0.05$);等位基因 B 和 b 的分布频率在 AS 组中分别为 11.2%(24/107)和 88.8%(190/214),在对照组中分别为 3.9%(13/166)和 96.1%(319/332),经 χ^2 检验,两者差异有统计学意义($\chi^2 = 10.22, P < 0.05$)。在参加试验的 2 组人群中均未发现 BB 基因型个

体。

2.5 VDR 基因型与 CRP、ESR 关系 对 AS 组中不同的 VDR 基因型对应的血清 C 反应蛋白(CRP)浓度及红细胞沉降率(ESR)进行统计分析,Bb、bb 基因型中 CRP 浓度分别为(31.7 \pm 25.9)、(28.6 \pm 25.2)mg/L,差异无统计学意义($t = 0.34, P > 0.05$),ESR 分别为(45.2 \pm 31.4)、(31.4 \pm 24.6)mm/h,差异也无统计学意义($t = 1.51, P > 0.05$),可见 VDR 基因型与 CRP、ESR 之间没有相关性。

3 讨 论

AS 的病因目前虽尚未明确,但认为与遗传、感染、免疫、环境等因素有关,其中遗传因素起主导作用[4]。HLA-B27 已被证实是 AS 最主要的易感基因,但是大约 80%的 HLA-B27 阳性者并不发生 AS,而大约 10%的 AS 患者 HLA-B27 阴性,提示还有其他因素参与发病[5]。维生素 D 受体基因是目前国际上有关骨质疏松最受关注且最有争议的一个候选基因,研究发现 AS 常伴有明显的骨质疏松,且由于 VDR 基因在基因与环境及基因与基因之间的相互作用,以及在骨和矿物质的代谢中的作用,因此推测 VDR 可能在 AS 的候选基因里占有重要地位[6-7]。

VDR 基因定位于 12q12~q14,有 11 个外显子,全长 75 kb。近年报道 VDR 基因多态性与 4 个单核苷酸多态性(SNP)位点有关,分别为 2 号外显子的 FokI 位点、第 8 内含子的 BsmI 位点、ApaI 位点及第 9 外显子的 TaqI 位点。澳大利亚学者首次报道 VDR 基因 FokI、BsmI、ApaI、TaqI 位点多态性与骨密度(BMD)水平密切相关,且占至遗传因素的 75%左右,而 BMD 水平的变化对骨质疏松起着重要作用。此后各个国家、各个地区学者对 VDR 基因与 BMD、骨质疏松相关性进行了大量研究,主要集中在 BsmI 和 FokI 多态性位点上,但不同地区、不同种族的研究结论不一。

EI-Shehaby 等[8]对 80 例终末期肾病患者和 40 例健康人进行对比研究,发现 BsmI 基因型在两组间无显著差异,患者组 B 等位基因频率 41.6%,健康对照组 39.2%,然而患者组 BB 基因型血浆中 25-OH-VitD 水平较 Bb 和 bb 基因型显著降低,等位基因 B 的频率与左心室体积指数呈正相关。通过 65 岁以上高加索人群 VDR 基因 FokI 和 BsmI 多态性与心血管疾病体征和生化指标的相关性研究也表明,在男性中,BsmI 基因型 Bb 占 50%,bb 占 23%,BB 占 27%,FokI 基因型 Ff 占 50%,ff 占 18%,FF 占 32%,在女性中,BsmI 基因型 Bb 占 48%,bb 占 20%,BB 占 32%,FokI 基因型 Ff 占 48%,ff 占 22%,FF 占 30%,携带 b 等位基因的女性胰岛素抵抗指数与携带 B 的女性有差异,而携带 b 等位基因的男性胰岛素水平与携带 B 的男性有差异,男女之间基因型均无显著差异[9]。目前仅有 1 篇国外文献对 VDR FokI、BsmI 多态性与 AS 患者骨密度及炎症指标相关性进行报道,结果显示在男性 AS 患者里 VDR FokI 与脊柱 BMD 有关,女性的 BMD 与 VDR FokI、BsmI 都不相关[10]。目前有关 VDR 基因多态性与 AS 患者的相关性研究尚未见报道。

本研究结果显示汉族人群维生素 D 受体 BsmI 基因型以 bb 基因型为主,占 90%以上,未检出 BB 基因型,与来自哈尔滨地区和广西地区部分汉族人群及韩国的报道接近[11-13]。而西方国家报道,VDR 基因型分布以 Bb 最多,约占总基因型的 45%~55%,bb 基因型仅占 30%~40%[14-15]。由此可见,VDR 基因多态性存在种族和地域的差异,在不同地区人群中基因分布情况不完全相同,由此产生统计学上的频率偏移。

本研究对 AS 组患者及对照组健康者的基因多态性分析

结果显示, AS 组患者 BsmI 的基因频率、等位基因频率分布均与对照组健康者有显著性差异, AS 组患者中 Bb 基因型、B 等位基因频率均高于健康对照组, 提示 VDR BsmI 基因多态性与 AS 有一定的相关性, B 等位基因可能增加 AS 的易感性。本文通过对 AS 患者的研究提示: AS 的发生发展可能与 VDR 基因型有关, 如能早期进行 VDR 基因型检测, 及早干预, 对于预防 AS 的发生有重要意义。但是 VDR 基因多态性在 AS 的发病中所起的作用需要进一步阐明。

参考文献

[1] Pimentel-Santos FM, Ligeiro D, Matos M, et al. ANKH and susceptibility to and severity of ankylosing spondylitis[J]. J Rheumatol, 2012, 39(1): 131-134.

[2] Özbas H, Tutgun Onrat S, Özdamar K. Genetic and environmental factors in human osteoporosis[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(12): 11289-11296.

[3] Horst-Sikorska W, Dytfeld J, Wawrzyniak A, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms, bone mineral density and fractures in postmenopausal women with osteoporosis [J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(1): 383-390.

[4] Reveille JD. Recent studies on the genetic basis of ankylosing spondylitis[J]. Curr Rheumatol Rep, 2009, 11(5): 340-348.

[5] Braun J, Bollow M, Remlinger G, et al. Prevalence of spondylarthropathies in HLA-B27 positive and negative blood donors[J]. Arthritis Rheum, 1998, 41(1): 58-67.

[6] Monticeli OA, Teixeira Tde M, Chies JA, et al. Vitamin D and polymorphisms of VDR gene in patients with systemic lupus erythematosus[J]. Clin Rheumatol, 2012, 31(10): 1411-1421.

[7] Feng M, Li H, Chen SF, et al. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and risk of autoimmune thyroid diseases: a meta-anal-

ysis[J]. Endocrine, 2013, 43(2): 318-326.

[8] El-Shehaby AM, El-Khatib MM, Marzouk S, et al. Relationship of BsmI polymorphism of vitamin D receptor gene with left ventricular hypertrophy and atherosclerosis in hemodialysis patients[J]. Scand J Clin Lab Invest, 2013, 73(1): 75-81.

[9] Laczanski L, Milewicz A, Lwow F, et al. Vitamin D receptor gene polymorphism and cardiovascular risk variables in elderly Polish subjects[J]. Gynecol Endocrinol, 2013, 29(3): 268-272.

[10] Barbara M, Uwe L, Gerwig F, et al. Vitamin D receptor initiation codon polymorphism, bone density and inflammatory activity of patients with ankylosing spondylitis[J]. Osteoporos Int, 2003, 14(12): 995-1000.

[11] 王秀玲, 朱秀英, 聂英昆, 等. 地区部分汉族人群维生素 D 受体 BsmI 基因多态性与骨质疏松性骨折关系的研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2007, 13(10): 692-695.

[12] 郑敏, 罗建明. 广西地区儿童维生素 D 受体基因 BsmI 和 Tru9I 酶切位点多态性分别[J]. 实用儿科临床杂志, 2010, 25(7): 513-515.

[13] Kang TJ, Jin SH, Yeum CE, et al. Vitamin D Receptor Gene TaqI, BsmI and FokI Polymorphisms in Korean Patients with Tuberculosis[J]. Immune Netw, 2011, 11(5): 253-257.

[14] Mostowska A, Lianeri M, Wudarski M, et al. Vitamin D receptor gene BsmI, FokI, ApaI and TaqI polymorphisms and the risk of systemic lupus erythematosus[J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(2): 803-810.

[15] Fedirko V, Riboli E, Tjønneland A, et al. Prediagnostic 25-hydroxyvitamin D, VDR and CASR polymorphisms, and survival in patients with colorectal cancer in western European populations [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2012, 21(4): 582-593.

(收稿日期: 2013-05-20)

(上接第 2955 页)

是一种简便、安全、灵敏度较高的 EB 替代核酸染料, 能够很好地用于琼脂糖凝胶中核酸的常规染色。Gold View 虽然灵敏度可以达到实验室的常规检测需求, 价格也很便宜, 但是从影响细胞周期和增殖代谢的角度来讲, 存在一定的安全隐患。

由于本实验中所检测的 3 种核酸染料都是来源于市场上的即用型商品, 不了解其详细的配方和成分, 若要进一步研究核酸染料的致癌、致畸性, 则需要从其详细成分着手, 进一步通过动物实验确认, 例如通过裸鼠皮下注射试验、Ames 试验^[13]、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验、小鼠睾丸精母细胞染色体畸变等试验来确定其生物安全性。

应当指出的是, 核酸染料使核酸着色的机制都是要特异地与核酸结合, 从这个角度来讲, 核酸染料或多或少都存在一定的风险, 尤其是实验室工作人员、医院检验技师等与核酸染料长期接触的工作者, 要注意采取防护措施, 并且妥善处理废弃核酸染料和凝胶, 将核酸染料对环境的影响降到最低。

参考文献

[1] 蒋玲艳, 王林果. 核酸染料的应用研究进展[J]. 玉林师范学院学报: 自然科学, 2006, 27(3): 131-133.

[2] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南[M]. 2 版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 1995: 304-315.

[3] Bensaude O. Ethidium bromide and safety-readers suggest alternative solutions[J]. Trends Genet, 1988, 4(4): 89-90.

[4] Lunn G, Sansone EB. Ethidium bromide: destruction and decontamination of solutions[J]. Anal Biochem, 1987, 162(2): 453-458.

[5] 陈云娇, 陈莉敏, 美亮, 等. 核酸染料 Genefinder 使用方法的比较[J]. 生物技术, 2011, 21(5): 66-68.

[6] 刘歆, 徐根明, 郭江峰, 等. 基于 SYBR Green I 的双链 DNA 定量法[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(1): 55-56.

[7] Karlsen F, Steen HB, Nesland JM. SYBR Green I DNA staining in creases the detection sensitivity of viruses by polymerase chain reaction[J]. J Virol Methods, 2002, 55(1): 153-156.

[8] Singer VL, Lawlor TE, Yue S. Comparison of SYBR Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the Salmonella/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test)[J]. Mutat Res, 2002, 439(1): 37-47.

[9] Martin SE, Adams GH, Schillaci M, et al. Antimutagenic effect of selenium on acridine orange and 7, 12-dimethylbenz[α]anthracene in the Ames Salmonella/microsomal system[J]. Mutat Res, 1981, 82(1): 41-46.

[10] 汪姝, 李彪, 刘惠民. 四种核酸染料在琼脂糖凝胶电泳中的染色特性[J]. 吉林农业, 2011, 261(11): 74.

[11] 黄庆, 府伟灵, 赵渝徽, 等. 核酸荧光染料在琼脂糖凝胶电泳中的染色特性[J]. 中华医院感染学杂志, 2006, 16(11): 1316-1318.

[12] 李丽. 高灵敏度荧光染料 SYBR 的性质及应用[J]. 实用医技杂志, 2012, 19(8): 868-869.

[13] Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test[J]. Mutat Res, 1975, 31(6): 347-3641.

(收稿日期: 2013-05-15)