

VDR 基因单核苷酸多态性与大骨节病关联分析

张 利 郭 雄 王 磊

摘 要 **目的** 探讨 VDR 基因 2 个 SNP 位点多态性与大骨节病的关联关系。**方法** 选取 64 例大骨节病患者和 60 例健康人群为病例组和对照组,对所选基因的两个 SNP 位点进行基因分型,计算相应人群中 2 个位点的基因型频率、单位点等位基因频率,比较各组间基因型频率、单位点等位基因频率的差异。**结果** rs2254210 和 rs2189480 在基因型频率、单位点等位基因频率及单倍型重构分析中与大骨节病均无显著性关联。**结论** 在后续的研究中进一步增大样本量和 SNP 标记密度,进行全基因关联分析,以验证 VDR 基因与大骨节病的相关性。

关键词 单核苷酸多态性 大骨节病 维生素 D 受体

Association Analysis between Polymorphism in VDR and Kashin – Beck Disease. Zhang Li, Guo Xiong, Wang Lei. Class 87, Zonglian Shuyuan of Medical College, Xi'an Jiaotong University, Shaanxi 710061, China

Abstract Objective To investigate the association between the polymorphisms of two SNP loci of vitamin D receptor (VDR) gene and Kashin – Beck disease (KBD). **Methods** We classified the two SNP loci of VDR gene by MassARRAY® iPLEX Gold SNP among the 64 KBD patients and 60 healthy controls, calculated and compared the genotypic frequency of the two groups to find the potential association between these polymorphisms and KBD. **Results** The correlation analysis based on single locus and haplotypes in rs2254210 and rs2189480 showed no significant association with KBD. **Conclusion** We should increasing the sample size and the SNP mark density in the following research, to carry on the entire gene connection analysis and confirm the relevance between VDR gene and Kashin – Beck disease.

Key words Single Nucleotide Polymorphisms (SNP); Kashin – Beck Disease (KBD); VDR

大骨节病 (Kashin – Beck disease, KBD) 是一种以软骨病变为特征的地方性、慢性变形性骨关节病,因其分布广、发生率和致残率高,其发病机制研究一直是国内外关注的重点课题之一。自 1849 年报道以来,历经 160 余年至今病因未明,既往曾提出多种病因假说,主要集中在环境低硒和粮食中 T – 毒素超常聚集上,这些学说可解释部分现象,但并不能解释所有病理变化,从而无法采取有效的防治措施^[1,2]。现有研究表明, KBD 是符合环境 – 基因交互作用的复杂性疾病,环境暴露会启动机体内与关节软骨发育相关的一些环境反应基因^[3~5]。国内外研究证实维生素 D 受体 (vitamin D receptor, VDR) 基因多态性可影

响软骨发育及骨钙沉积,与类风湿性关节炎、骨质疏松症及特发性关节炎等疾病密切相关^[6~10]。本研究选取 VDR 基因上 2 个酶切位点 (rs2254210, rs2189480) 进行与 KBD 的相关性研究。

材料与方法

1. 研究对象:以陕西省永寿、麟游两县 KBD 病区人群为目标人群,依据《大骨节病诊断标准》(GB16003 – 1995) 来诊断或排除研究对象,结合临床诊断信息对所选病例拍右手正位 X 线片进行确诊和 KBD 分度。本研究得到西安交通大学医学院伦理委员会的批准。所有受试者均经过本人或其监护人知情并同意,并告知用于科学研究的目的,签署相应的知情同意书。所有受试者均为陕西省本地人,外来人口排除在筛选范围之外。本次研究研究对象皆为汉族且无任何关联个体 (无血缘关系)。最终共确定 124 名研究对象 (KBD 病例组 64 例,正常对照组 60 例)。组间年龄及性别无显著性差异 ($\chi^2 = 1.25, P = 0.263$) (表 1)。

2. 研究方法:(1) 标本采集及基因组 DNA 提取:每名研究对象被采集 2ml 外周静脉血,使用 EDTA 抗凝后备用。外周血基因组 DNA 提取参照美国 Promega 公司外周血基因组 DNA 提取试剂盒使用说明书操作。(2) SNP 位点选取,引物设计及合成:选取 VDR 基因上的酶切 SNP 位点 rs2254210、rs2189480 作为研究的可疑致病位点,采用 Sequenom MassAR-

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (81201384); 浙江省自然科学基金资助项目 (LQ12H06005); 西安交通大学本科生物科研训练和实践创新基金资助项目 (2011082); 国家级大学生创新性实验计划课题资助项目 (101069829)

作者单位:710061 西安交通大学医学院宗濂书院临床 87 班 (张利), 公共卫生地方病研究所暨环境与疾病相关基因教育部重点实验室 (郭雄); 310006 南京医科大学附属杭州市第一人民医院骨科 (王磊)

通讯作者:王磊, 电子信箱: wldzszs@163.com

表 1 KBD 病例组及对照组特征比较 (n)

组别	性别		平均年龄 (岁)	X 线表现			临床分级			
	男性	女性		正常	骨端病变	关节变形	0 度	I 度	II 度	III 度
病例组	32	32	44.73	—	39	25	1	8	20	35
对照组	24	36	40.63	60	—	—	60	—	—	—
合计	56	68	42.7	60	39	25	61	8	20	35

RAYAssay Design 3.1 (美国 Sequenom 公司) 进行引物设计, 上海英骏生物公司 (Invitrogen) 负责引物合成。并利用 MassAR-RAY® iPLEX Gold SNP 基因多态性检测对以上两个位点进行基因分型 (陕西北美基因股份有限公司)。所选 2 个 SNP 位点的引物序列: rs2254210; 1st - PCR: 5' - ACGTTGGATG-GATGGATTTCATACTTGAGG - 3', 2st - PCR: 5' - ACGTTG-GATGTGAGAAGGCCTTCCCAAAG - 3'; rs2189480; 1st - PCR: 5' - ACGTTGGATGTGGAGCTGGGAGCAAACCTT - 3', 2st - PCR: 5' - ACGTTGGATGAGGAAGAGGACACCATTACG - 3'。

3. 统计学方法: 将 KBD 病例组和正常对照组基因型频数进行 Hardy - Weinberg 平衡检验 (HWE), 采用 SPSS 13.0 软件进行数据分析, 卡方检验分析病例组和对照组中基因型的分布差异, 二分类 Logistic 回归校正性别和年龄的影响后进行危险度分析。χ² 检验以获得 KBD 病例组与对照组间的差别有无统计学意义, 计算比值比 (OR) 以评价 KBD 与特定表型的相对风险, P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. HW 平衡检验结果: 表 2 示 VDR 基因上 rs2254210 和 rs2189480 两个 SNP 位点的 Hardy - Weinberg 检验结果, rs2254210 的 P > 0.05, 表明这个位点在人群中的分布符合 Hardy - Weinberg 平衡。而 rs2189480 的 P < 0.05, 进一步对该位点的 KBD 病例组和正常对照组分别进行 Hardy - Weinberg 检验, 结果显示 (表 3): 该位点 KBD 病例组 P < 0.05, 而正常对照组 P > 0.05。Nielsen 等^[11]的研究表明, 在病例

中偏离 Hardy - Weinberg 平衡有可能意味着该位点具有易感性。所以推测 KBD 可能影响 VDR 基因上 rs2189480 位点患者人群中的 Hardy - Weinberg 平衡。同时, 本研究中的两个 SNP 位点的最小等位基因频率分别为 0.292 和 0.326, 均 > 0.05, 表明其已具备足够的信息量进行进一步的关联分析。

表 2 SNP 多态性位点 HW 检验及基本信息

位点编号	观测 杂合度	期望 杂合度	HWE	最小等位 基因频率	等位 基因
rs2254210	0.433	0.414	0.5934	0.292	G > A
rs2189480	0.331	0.440	0.0070	0.326	A > C

表 3 Rs2189480 位点病例组与对照组 HW 检验及基本信息

位点编号	观测 杂合度	期望 杂合度	HWE	最小等位 基因频率	等位 基因
rs2189480 病例组	0.293	0.457	0.0063	0.353	A > C
rs2189480 对照组	0.367	0.420	0.3253	0.300	A > C

2. 关联分析: VDR 基因上 rs2254210 和 rs2189480 两位点的基因型个数、比值比、单位点等位基因频率和基因型频率比较见表 4。rs2254210 和 rs2189480 在基因型频率, 单位点等位基因频率分析中均无与 KBD 的关联。

表 4 病例组对照组关联分析结果

基因型	病例组 (n)	对照组 (n)	OR	χ ²	P	χ ²	P
				等位基因频率	等位基因频率	基因型频率	基因型频率
rs2254210				0.030	0.866	0.570	0.752
A/A	5	4	1				
A/G	24	28	0.686				
G/G	31	28	0.886				
rs2189480				1.270	0.260	1.990	0.370
A/A	29	31	1				
A/C	17	22	0.826				
C/C	12	7	1.833				

讨 论

KBD 是一种以损害儿童发育过程中软骨内化骨

型的透明软骨 (骺软骨、骺板软骨和关节软骨) 并导致软骨内化骨障碍的地方性、畸形性骨关节病。其作

为一种特殊类型骨关节病,与各类骨关节炎病变发生发展病程中具有相似的软骨病变,因此在探索 KBD 发病机制过程中,借鉴各类骨关节炎在基因位点方面的研究成果将是一种有效的研究途径^[12]。

人类 VDR 基因位于 12 号染色体长臂 1 区 3 带上,全长 65kb,由 9 个外显子和 8 个内含子构成。其编码的 VDR 为核内受体蛋白,从一级结构上看,VDR 与其他甾体激素受体、甲状腺激素受体及视黄醇受体等具有高度同源性,属于类固醇激素/甲状腺受体超家族的成员。VDR 是经典的配体活化转录调节蛋白,通过与 1,25 双羟维生素 D₃ [1,25-(OH)₂D₃] 结合形成复合物而实现其生物学活性作用,该复合物可与靶基因上游启动子区或调控区域上的特定 DNA 序列结合,从而对钙、磷代谢起到调节作用:位于肠道的 VDR 可增加小肠对钙、磷的吸收。位于肾脏的 VDR 可增加肾脏近端小管对钙、磷的重吸收。位于骨组织上的 VDR 的作用则是双向的,成骨细胞上的 VDR 能够促进骨桥蛋白、骨钙蛋白的合成,参与骨形成和矿化;而破骨细胞上的 VDR 可抑制其增殖并促进破骨细胞分化,促进骨钙、磷释放^[13]。近年来,VDR 基因多态性与各类骨关节炎及骨代谢疾病的相关性研究较多,国内外研究证实 VDR 基因多态性可影响软骨发育及骨钙沉积,与类风湿性关节炎、骨质疏松症及特发性关节炎等疾病密切相关。鉴于 VDR 基因在软骨发育及各类骨关节炎病变发生、发展过程中的重要性,本实验选取了该基因与 KBD 进行关联研究。根据 Hapmap 数据库,VDR 基因上共有 135 个已知 SNP,其中,VDR 基因位点 rs2254210 与髌骨关节炎患者有关联^[14,15]。孙晶晶等在对一个 4 代的髌臼发育不良的骨关节病变家系进行全基因组扫描亦发现该家系发病与 VDR 基因位点 rs2254210 有连锁。而,VDR 基因位点 rs2189480 则与骨质疏松、软骨代谢及骨钙沉积有显著性关联。受实验条件及实验者水平限制,本实验选取了 rs2254210 和 rs2189480 两个位点作为该基因的研究位点。

本实验发现,rs2254210 和 rs2189480 在基因型频率,单位点等位基因频率分析中皆与 KBD 无关联。本研究所选样本病例对照的年龄性别均匹配,且为无关个体,可以排除年龄和性别混杂。rs2254210 位点对照组 Hardy - Weinberg 检验 $P > 0.05$,但是 rs2189480 位点病例组 Hardy - Weinberg 检验 $P < 0.05$,所以推测 KBD 可能影响 rs2189480 位点多态性

在病区人群中的分布。

KBD 发病机制的研究,目前已从环境因素、群体、个体、器官、细胞水平到现在的分子生物学、基因学等方向发展,取得了较大的进展。环境因素在 KBD 的发生发展中起着重要的作用已成为 KBD 研究的共识。Zhang 等研究发现 KBD 存在明显的家族多发性,但又不是绝对意义上的家族遗传病,研究还发现 KBD 患病人群具有 2 个突出的特点:家庭多发性和个体差异,这些表明遗传因素在 KBD 的流行中起一定作用,但遗传因素所起作用明显弱于环境致病因素,说明 KBD 是符合环境 - 基因交互作用的复杂性疾病。因而从基因水平筛选 KBD 软骨早期损伤的相关基因位点,有助于 KBD 分子生物学发病机制的研究。尽管笔者的研究结果显示,rs2254210 和 rs2189480 这两位点 KBD 无关联。但是,鉴于 VDR 在软骨及各类骨关节炎病变发生、发展过程中的重要性,可以知道对于该基因在 KBD 发病机制中的研究非常有意义。此外,本研究尚有一些方面需要完善,首先,包含的样本量相对较小,这可能会增加因抽样误差导致的偏倚。其次,本研究中的两个 SNP 本身的功能有限,提供的信息量较少,利用两个 SNP 位点分析评价基因的作用不够全面,因此有必要在后续的研究中进一步增大样本量和 SNP 标记密度。

参考文献

- 1 李群伟.关于大骨节病病因研究的探讨[J].泰山医学院学报,2010,31(5):396-398
- 2 郭雄.大骨节病病因与发病机制的研究进展及其展望[J].西安交通大学学报:医学版,2008,29(5):481-488
- 3 郭雄.大骨节病分子生物学与防治研究的新进展及展望[J].中国地方病学杂志,2010,29(5):473-474
- 4 王世捷,郭雄,左弘,等.大骨节病关节软骨细胞凋亡及其相关调控因子的表达[J].第一军医大学学报,2005,25(6):643-646
- 5 郭雄.大骨节病软骨细胞发生坏死的分子生物学机制[J].西安交通大学学报:医学版,2005,26(3):201-204
- 6 Blain H,Chavassieux P,Portero - Muzy N,*et al.* Osteoarthritis is associated with higher bone mineral density and increased bone loss with age[J].Bone,2008,43(5):862-868
- 7 Andersson JE,Vogel I,Uldbjerg N. Serum 17 beta - estradiol in newborn and neonatal hip instability[J].J Pediatr Orthop,2002,22:88-91
- 8 Maalej A,Petit - Teixeira E,Michou L,*et al.* Association study of VDR gene with rheumatoid arthritis in the French population[J].Genes Immun,2005,6(8):707-711
- 9 Ak Dq Kahraman H,Dursun E,Duman BS,*et al.* Polymorphisms at the ligand binding site of the vitamin D receptor gene and osteomalacia[J].Dis Markers,2005,21(4):191-197
- 10 Burger H,van Daele PL,Odding E,*et al.* Association of radiographi-

- cally evident osteoarthritis is associated with higher bone mineral density and increased bone loss with age[J]. The Rotterdam Study, 1996, 39:81 - 86
- 11 Nielsen DM, Ehm MG, Weir BS. Detecting marker disease association by testing for hardy - weinberg disequilibrium at a marker locus[J]. Am J Hum Genet, 1998, 63(5):15312 - 15401
- 12 张利, 王磊, 谢志超, 等. 大骨节病的短串联重复序列和单核苷酸多态性研究进展[J]. 中国地方病防治杂志, 2012, 27(3):192 - 194
- 13 Lombard Z, Dalton DL. Association of HLA - DR, - DQ, and vitamin D receptor alleles and haplotypes with tuberculosis in the Venda of South Africa[J]. Hum Immunol, 2006, 8:643 - 654
- 14 Granchi D, Stea S. Association of two gene polymorphisms with osteoarthritis secondary to hip dysplasia[J]. Clin Orthop Relat Res, 2002, 403:108 - 117
- 15 Sionek A, Czubak J, Kornacka M, et al. Evaluation of risk factors in developmental dysplasia of the hip in children from multiple pregnancies; results of hip ultrasonography using Grafs method[J]. Ortop Traumatol Rehabil, 2008, 10(2):1115 - 1130
- (收稿日期:2012 - 09 - 03)
- (修回日期:2012 - 09 - 29)

多巴胺、硝酸甘油诱导的血管舒缩异常大鼠神经肽表达和中脑 c - fos 免疫反应性

章正祥 曹克刚 范吉平 高永红

摘要 目的 探讨多巴胺、硝酸甘油诱导的血管舒缩异常大鼠血神经肽和中脑导水管周围灰质 c - fos 的表达。方法 大鼠随机分为溶媒组、多巴胺组、模型组,造模后 4h 取血放射免疫测降钙基因相关肽(CGRP)、内皮素(ET)、P 物质(SP)、 β - 内啡肽(β - EP),取脑、切片免疫组织化学观察中脑导水管周围灰质(PAG) c - fos 蛋白表达。结果 偏头痛模型组 ET、SP 含量较溶媒组明显升高, β - EP 含量较溶媒组明显降低,模型组和多巴胺组 c - fos 阳性细胞面积明显大于溶媒组。结论 多巴胺、硝酸甘油诱发的血管舒缩模型在一定程度上模拟了偏头痛的发病机制。

关键词 多巴胺 硝酸甘油 血管舒缩 神经肽 C - fos

Neuropeptide Expression and Midbrain C - fos Immunoreactivity of Abnormal Vasomotor Rat Induced by Dopamine, Nitroglycerin.

Zhang Zhengxiang, Cao Kegang, Fan Jiping, Gao Yonghong. Department of Neurology, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine First Affiliated Hospital, Zhejiang Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang 310006, China

Abstract Objective To explore expression of blood neuropeptide and c - fos of midbrain periaqueductal gray matter of abnormal vasomotor rat induced by dopamine, nitroglycerin. **Methods** Rats were divided into 3 groups: solvent group, dopamine group, model group. 4 hours after model establishment, rat blood was taken to measure calcitonin gene - related peptide (CGRP), endothelin (ET), P substance (SP), β - endorphin (β - EP) with radio - immunity, while the brain was taken to observe periaqueductal gray (PAG) c - fos protein expression with immunohistochemistry sections. **Results** ET and SP content in model group were higher than those in solvent group. β - EP content was significantly lower than solvent group. Total area of c - fos positive cells in model group and DA group were significantly increased than solvent group. **Conclusion** Vasomotor model induced by dopamine, nitroglycerin simulated some migraine pathogenesis to a certain extent.

Key words Dopamine; Nitroglycerin; Vasomotor; Neuropeptide; C - fos

1938 年, Wolff 提出血管学说, 认为偏头痛是原

发性脑血管性疾病, 血管舒缩机制开始成为偏头痛发病的主要学说之一。其与皮质扩散抑制(CSD)学说(解释偏头痛先兆发病机制)、三叉神经血管学说(TVS)(解释偏头痛头痛发病机制)密切相关, 贯穿于整个偏头痛发病的始终。前期研究表明皮下注射多巴胺(DA), 间隔 45min 再次注射硝酸甘油(GTN)可建立具有时相性特点的血管舒缩异常大鼠模型^[1]。多巴胺占有脑内儿茶酚胺类神经递质含量

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30600828)

作者单位: 310006 杭州, 浙江中医药大学附属第一医院、浙江省中医院神经内科(章正祥); 100700 北京中医药大学东直门医院神经内科(曹克刚); 100700 北京, 中国中医科学院(范吉平); 100700 北京中医药大学中医内科学教育部重点实验室、国家中医药管理局脑病重点研究室(高永红)

通讯作者: 曹克刚, 电子信箱: kgdoctor@sina.com