·论著·

我国四种民族维生素 D 受体基因多态性分布的研究

张红红 陶国枢 高宇红 刘建伟 吴青 牟小芬 胡亚卓 陈瑞英 冷兴文

摘要：目的 维生素 D 受体(VDR)基因与骨密度和骨量密切相关。但是它在不同人群和种族中的分布仍有差异。本研究旨在分析中国汉族、维吾尔族、哈萨克族和蒙古族维生素 D 受体基因多态性分布。**方法** 应用聚合酶链反应限制性片长度多态性技术，分别对我国 179 名汉族、122 名维吾尔族、63 名哈萨克族和 112 名蒙古族健康绝经后妇女的 VDR 基因型进行分型，并计算其基因频率分布。**结果** 汉族、维吾尔族、哈萨克族和蒙古族绝经后妇女 bb 基因型频率分别为 90.5%、69.67%、38.1% 和 50%，上述四种民族 BB 基因型频率分别为 0%、4.1%、6.35% 和 4.46%，汉族与维吾尔族、哈萨克族和蒙古族之间 VDR 基因型频率分布比较，差异有非常显著性($P < 0.001$)，哈萨克族与欧美人种比较，VDR 基因型相差不显著。**结论** 我国汉族与维吾尔族、哈萨克族和蒙古族之间 VDR 基因型多态性具有种族差异性，这种种族差异性与骨质疏松的相关性有待于进一步研究。

关键词：维生素 D 受体基因；遗传多态性；汉族；维吾尔族；哈萨克族；蒙古族

Studies on the distribution of vitamin D receptor gene polymorphism in Han, Uygur, Kazak and Mongoloid nationality in China *ZHANG Honghong, TAO Guoshu, GAO Yuhong, et al. Institute of Geriatrics and Gerontology, Chinese PLA General Hospital Beijing* 100853, China

Abstract: Objective To determine the distribution of vitamin D receptor gene polymorphism in women of Han, Uygur, Kazak and Mongoloid nationality in China. **Methods** Polymorphism defined by the Bsm1 restriction enzyme using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism in healthy postmenopausal women of 179 Han nationality, 122 Uygur nationality, 63 Kazak nationality and 112 Mongoloid nationality. The genotype frequencies of the VDR were calculated later using the Hardy-Weinberg equilibrium formula. **Results** For women of Han, Uygur, Kazak and Mongoloid national, the BB genotypes accounted for 0%, 4.1%, 6.35% and 4.46%, the bb genotypes accounted for 90.5%, 69.67%, 38.1% and 50% respectively. We found that was a significant difference between women of Han, Uygur, Kazak, and Mongoloid nationality. Compared to Caucasian population, there was no significant in VDR gene in Kazak nationality. **Conclusions** There was a significant difference between women of Han and Uygur, Kazak, and Mongoloid nationality in VDR genotype. The present study provide further evidence on the different pathogeny of osteoporosis in various ethnic groups.

Key words: Vitamin D receptor gene; Genetic polymorphism; Han nationality; Uygur nationality; Kazak nationality; Mongoloid nationality

维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)基因多态性由位于 12 号染色体(12q13-14)的等位基因控制，1994 年，澳大利亚学者 Morrison 等[1] 研究报告，VDR 基因在内切酶 Bsm I、Apa I、Taq I 作用下，呈限制性内切酶片段长度多态性，并且与骨密度(bone mineral density, BMD)密切相关，而 BMD 水平的变化对骨质疏松起着重要作用，以后各国学者对 VDR 基因多态性与 BMD、骨质疏松相关性进行广泛研究，结论有一定争议。

VDR 基因多态性分布具有种族差异性。为探讨我国不同种族之间 VDR 基因多态性分布规律，本研究采用聚合酶链反应限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-restrictive fragment length

基金项目：军队十五课题基金资助项目(A 类 01MA118)

作者单位：100853 北京，解放军总医院老年医学研究所(张红红、陶国枢、高宇红、刘建伟、吴青、牟小芬、胡亚卓) 兰州军区乌鲁木齐总医院(陈瑞英、冷兴文)

通讯作者：张红红，Email：zhanghhqu@hotmail.com

polymorphism, PCR-RFLP)技术,分析了 179 名汉族、122 名维吾尔族、63 名哈萨克族和 112 名蒙古族健康绝经后妇女的 VDR 基因型,这为进一步观察不同种族 VDR 基因多态性与 BMD 和骨质疏松相关性的研究提供依据。

1 材料和方法

1.1 对象

研究对象分为汉族组、维吾尔族组、哈萨克族组和蒙古族组。汉族组为我院体检人员 179 例,平均年龄 58.78 岁;维吾尔族组 122 例,平均年龄 56.49 岁;哈萨克族组 63 例,平均年龄 55.35 岁;蒙古族族组 112 例,平均年龄 57.43 岁。所有对象均为绝经 3 个月以上的健康妇女,相互之间无血缘关系,并且均未应用过影响骨代谢的药物。

1.2 研究方法

1.2.1 DNA 提取:取全血 2 ml,经典法[2]提取基因组 DNA。

1.2.2 PCR 扩增 VDR 基因:引物按参考文献设计[3]。序列为 Primer 1, 5′-GAACCAAGACTACAA-GTACCGCGTCAGTGA-3′; Primer 2, 5′-TGGCGGCAG-CGGATGTACGTCTGC-3′。反应体系为 50 μl,其中含 10×扩增缓冲液; dNTPs 各 200 μmol/L; Primer 1,2 各 0.5 μmol/L 模板 DNA 3 μl(约 200 ng),置热循环仪(Ericom INC)中 95℃预变性 7 min,再加 Taq DNA 聚合酶 2 U,按下列程序循环 35 次,即 95℃变性 1 min, 70℃退火 1 min, 72℃延伸 2 min,最后于 72℃再延伸 7 min。取产物 5 μl 经 1%琼脂糖凝胶电泳, EB 染色,紫外灯下观察扩增是否成功。

1.2.3 扩增产物的限制性酶切:PCR 扩增产物 10 μl(约 0.3 μg)直接用 2.5 U Bsml 酶切,65℃,过夜。反应终止后,产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳, EB 染色 40 min,以 DNA 片段长度标准物为参考,紫外检测仪下观察结果并照像。VDR 基因判定参照文献方法[1],即缺乏相应酶切位点为 BB 型(1850 bp)、Bb 型(1850、1200、650 bp)为杂合子、bb 型(1200、650 bp)则代表存在相应酶切位点的等位基因,见图 1。

1.2.4 BMD 测定:采用美国 Lunar 公司 DPX-L 型双能 X 线吸收仪(DEXA)检测 BMD。

1.2.5 统计学处理:采用基因计数法计算各组的基因型和等位基因频率。应用 SPSS 10.0 软件做统计学处理。各组基因型和等位基因频率之间的比较用 pearson χ^2 检验。

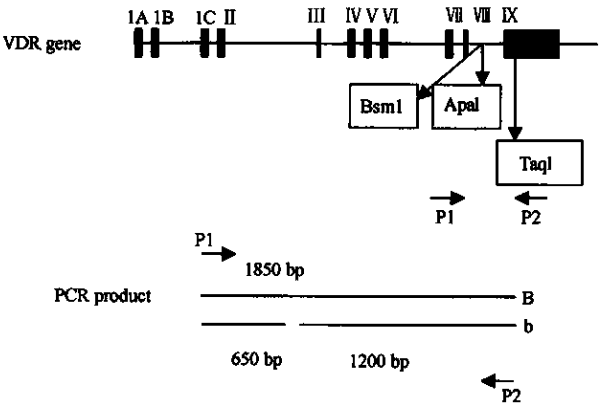

图 1 VDR 基因 Bsm 1 酶切图谱

2 结果

2.1 汉族与维吾尔族、哈萨克族和蒙古族 VDR 基因型和等位基因频率分布:按 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律计算,结果见表 1。

汉族 bb、Bb 基因型频率分布分别为 90.5%、9.5%,未见 BB 型。维族 bb、Bb、BB 基因型频率分布分别为 69.67%、26.23%、4.1%。哈萨克族 bb、Bb、BB 基因型频率分布分别为 38.1%、55.56%和 6.35%。蒙古族 bb、Bb、BB 基因型频率分布分别为 50%、45.54%和 4.46%。汉族与维吾尔族、哈萨克族和蒙古族之间 VDR 基因型频率分布比较,差异非常显著性($P < 0.001$)。

表 1 四民族 VDR 基因型和等位基因频率比较

组别 Group	例数 (n)	基因型(%)* Genotype(%)			等位基因(%)# Allele(%)	
		bb	Bb	BB	b	B
Han(汉族)	179	90.5	9.5	0	4.75	95.25
Uygur(维族) *	122	69.67	26.23	4.1	17.21	82.79
Kazak(哈族) *	63	38.1	55.56	6.35	34.13	65.88
Mongoloid(蒙族) *	112	50	45.54	4.46	27.23	72.77

注:$\chi^2 = 86.616$, * $P < 0.001$, $\chi^2 = 80.438$, # $P < 0.001$

2.2 不同人群中 VDR 基因型频率分布:汉族、维族、哈萨克族和蒙古族 VDR 基因组与不同国家的人种比较见表 2。

表 2 显示,汉族的 VDR 基因型频率分布与美国、澳大利亚、法国和日本比较,差异有非常显著性意义($P < 0.001$)。

表 2 不同人群 VDR 基因型频率分布(%)

组别 Group	例数 (n)	基因型 Genotype(%)			作者及文献 Reference
		bb	Bb	BB	
Han(汉族)	179	90.5	9.5	0	Present study(本文)
Uygar(维族)	122	69.67	26.23	4.1	Present study(本文)
Kazak(哈族)	63	38.1	55.56	6.35	Present study(本文)
Mongoloid(蒙族)	112	50	45.54	4.46	Present study(本文)
USA*	85	28	55	17	Hustmyer 等[4]
Australia*	244	28	50	22	Morrison 等[1]
France*	189	32	51	17	Garnero 等[5]
Japan*	488	77.1	21.5	1.4	Tokita 等[6]
Korea	70	85.7	12.9	1.4	Lim 等[3]

注:与汉族比较 * $P < 0.001$

3 讨论

国外研究资料显示,健康人群中,美国、澳大利亚、法国以 Bb 基因型最多,其次为 bb 型,BB 型占 17% ~ 22%,Morrison 等研究认为,60 岁以上健康妇女,75%的 BB 基因型的 BMD 低于骨折阈,骨质疏松的患者,BB 基因型表现极为活跃。

就人种学来说,汉族、蒙族和日本、韩国属于蒙古人种,哈萨克族、维族和欧美国家同属高加索人种。本研究首先获得了中国汉族、维族、蒙族和哈萨克族 VDR 基因多态性的分布频率,结果显示汉族、维族和蒙族均以 bb 基因型最多,分别为 90.5%、69.67%和 50%,这与韩国、日本接近,汉族未检测出 BB 基因型。哈萨克族与欧美人种比较,VDR 基因型相差不显著,与汉族、韩国和日本相差显著。

不同民族 VDR 基因多态性分布可能与人群所处的生活习惯和地理环境等密切相关[7,8]。

我们研究不同民族基因多态性分布将有助于探讨骨质疏松的遗传机制和对其诊断、治疗均具有一定的指导意义。

【参考文献】

[1] Morrison NA, Qi JC, Tokita A, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. Nature, 1994, 367: 284-287.

[2] Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd eds. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989: 931-958.

[3] Lim SK, Park YS, Park JM, et al. Lack of association between vitamin D receptor genotypes and osteoporosis in Koreans. J Clin Endocrinol Metab, 1995, 80: 3677.

[4] Hustmyer FG, Del uca HF, Peacock M. Apa I, Bsm I, EcoR V and Taq I polymorphism at the human vitamin D receptor gene locus in Caucasians, Blacks and Asians. Human Molecular Genetics, 1993, 2: 487.

[5] Garnero P, Borel O, Sorney-Rendu E, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms do not predict bone turnover and bone mass in healthy Japanese woman. J Bone Miner Res, 1995, 10: 1283-1288.

[6] Tokita A, Matsumoto H, Morrison NA, et al. Vitamin D receptor alleles, bone mineral density and turnover in premenopausal Japanese women. J Bone Miner Res, 1996, 11: 1003-1009.

[7] Yide M, Jie L, Peiying H, et al. Correlations between bone turnover markers, 1, 25-dihydroxyvitamin D3 and polymophism of vitamin D receptor gene in elderly men. Chinese Journal of Clinical Rehabililation, 2004, 8: 7469-7471(in Chinese).

[8] Ying L, Zhonghou L. Genetic factors dnd bone mass. Chinese Journal of Osteoporosis, 2005, 11: 269-272(in Chinese).

(收稿日期:2005-10-18)