

# 我国汉族儿童维生素 D 受体基因多态性分布

黄新文<sup>1</sup> 殷怀明<sup>2</sup> 戴玉景<sup>3</sup>

(1.兰州医学院第二附属医院; 2.甘肃省建筑职工医院; 3.兰州医学院解剖教研室, 兰州 730000)

**提 要:** 目的: 了解我国汉族儿童维生素 D 受体(VDR)基因多态性分布。方法: 利用限制性内切酶 BsmI, 采用聚合酶链反应限制性片段长度多态性技术(PCR-RFLP), 对 169 名健康汉族儿童进行了 VDR 基因分型, 并计算其基因型频率分布。结果: 中国汉族儿童 VDR 基因 bb、Bb、BB 基因型分别为 91.12%、7.1%、1.78%, 明显不同于高加索人种, 与韩国人较为相似。结论: VDR 基因多态性具有种族差异性。

**关键词:** 维生素 D 受体, 基因多态性, 汉族儿童

## The Frequencies of the Vitamin D Receptor Gene Alleles in Children of Han Nationality in China

Huang Xinwen, Yin Huaiming, Dai Yujing, Department of Pediatrics, The Second Affiliated Hospital, Lanzhou Medical College, Lanzhou 730000.

**Abstract:** Objective: To investigate the frequencies of vitamin D receptor gene polymorphism in children of Han nationality in china. Methods: The polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism was used to detect VDR genotypes of BsmI restriction enzyme in 169 healthy children of Han nationality. The genotype frequencies of VDR were calculated later. Result: The bb, Bb and BB genotype accounted for 91.12%, 7.1%, 1.78% respectively, which were different from those in Caucasians, but similar to those in Koreans. Conclusion: VDR genotype was different in various ethnics.

**Key words:** Vitamin D receptor, Gene polymorphism, Han-Chinese children.

Morrison<sup>[1]</sup>等报告在人类维生素 D 受体(VDR)基因上的等位基因改变是影响骨代谢的主要遗传因素。随后, 有关 VDR 基因多态性与骨钙代谢间的关系引起人们广泛关注。然而, 从近年来的研究结果来看, 不同地区、种族或人群间的研究结论不尽相同。因此, 笔者对一组汉族儿童 VDR 基因多态性进行测定, 以期了解我国汉族人维生素 D 受体基因多态性分布, 为进一步观察其与骨代谢关系奠定基础。

### 材料和方法

1.对象 2001年1月~5月我院儿童保健科无血缘关系的正常汉族体检儿童169名。其中:(1)男91名, 年龄5月~3.5岁, 平均 $1.32 \pm 1.1$ 岁;(2)女78名, 年龄3月~3岁, 平均 $1.25 \pm 0.8$ 岁。所有对象均排除遗传性骨疾病。

#### 2.方法

(1)DNA提取: 取全血2ml, 经典法<sup>[2]</sup>提取基因组DNA。

(2)PCR扩增: VDR基因引物按照参考文献设计<sup>[1]</sup>。序列为

P1, 5'-CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA-3'; P2, 5'-ACCAGGGAAGAGGTCAA GGG-3'。反应体系为30ul, 其中含 $10 \times \text{Buffer}$ 3ul; 氯化镁1.5 mmol/L; dNTP 200umol/L; 引物各0.2 umol/L; TagDNA聚合酶2U; 模板DNA 2ul, 以上成分混匀后, 其上覆盖30ul石蜡油以防

蒸发。置于 PCR 自动循环仪中 95℃ 预变性 10min。按下列程序循环 32 次, 即 94℃ 变性 45s, 62℃ 复性 45s, 72℃ 延伸 105s。最后于 72℃ 再延伸 10min。取扩增产物 5ul 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增是否成功。

(3) 扩增产物的限制性酶切(RFLP) 反应体系为 20ul, 其中含 10×Buffer 2ul, PCR 扩增产物 10ul 及限制内切酶 BsmI 2.5U, 置 37℃ 水浴过夜, 酶切产物于 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 以 DNA 片段长度标准物为参考, 紫外灯下观察结果并照像。

(4) 统计学处理 采用 SPSS 统计软件, 基因型频率比较采用  $\chi^2$  检验。基因计数法计算基因型频率。

## 结果

1. PCR 结果 扩增出长约 800bp 特异性片段。

2. 酶切结果 VDR 基因型判定参照文献<sup>[1]</sup>方法, 即存在 BsmI 酶切位点的纯合子 (bb), 显示 650bp 与 150bp 2 条带; 缺乏 BsmI 酶切位点的纯合子 (BB), 显示 800bp 1 条带; 杂合子 (Bb) 显示以上 3 条带。

3 VDR 基因多态性分布基因型 bb、Bb、BB 分别为 91.12% (154/169)、7.1% (12/169)、1.78% (3/169), 其中男性分别为 92.31% (84/91)、7.69% (7/91)、0%, 女性分别为 89.74% (70/78)、6.41% (5/78)、3.85% (3/78), 男女基因型频率比较差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。

## 讨论

本实验采用 PCR-RFLP 技术对中国汉族儿童限制性内切酶 BsmI 酶切位点 VDR 基因多态性分布进行研究, 揭示了中国汉族儿童 VDR 基因多态性分布情况, 为儿童骨钙代谢及骨代谢疾病遗传学研究提供依据。

本研究结果与国外同类研究结果进行比较 (表 1), 健康人群中, 高加索人种<sup>[1,3,4]</sup> VDR 基因多态性分布频率均以 Bb 基因型最多, 明显不同于我国汉族人 VDR 基因多态性分布 ( $P < 0.001$ ), 而与我国汉族同属蒙古人种的日本<sup>[5]</sup>及韩国<sup>[6]</sup>均以 bb 型最多, 这与本研究结果相近, 但与日本仍相差显著 ( $P < 0.001$ )。从而证实了 VDR 基因多态性具有种族差异性, 而环境因素对遗传因素影响可能使同一种族产生不同的基因频率。

表1 不同人群基因多态性频率的比较 [n (%)]

	n	bb	bB	BB	P
中国汉人	169	154 (91.12)	12 (7.1)	3 (1.78)	
高加索人	244	68 (28)	122 (50)	54 (22)	<0.001
日本人	102	56 (55)	39 (38)	7 (7)	<0.001
韩国人	70	60 (85.7)	9 (12.9)	1 (1.4)	>0.05

注: P 值均与中国汉人比较

综上所述, 对 VDR 基因多态性的研究, 使我们对不同种族间骨代谢疾病的发病差异有了进一步认识, 为深入研究骨代谢疾病的发病机制打下基础。由于骨代谢在遗传方面存在多样性, 也受到环境因素的影响, 故应尽早地针对 VDR 基因各型的骨代谢疾病进行预测, 及早发现相对高危人群, 从而达到早防早治的目的, 因此, 对正常人群的基因多态性分析仍具有深远意义。

(下接第 113 页)

相当复杂,今天还不能完全予以复原。比较明确的是闽方言应是六朝时期从江南一带向福建的移民所形成,赣客方言的共同源头则由中唐安史之乱迁移到江西北部与中部的移民所带来。到唐宋之际,这些移民中的一部分又迁移到赣闽粤交界地区而形成客方言。

现在的主要问题是:除了第一次北南方向的大移民,亦即永嘉丧乱以后北方向南方的移民有相对可靠的数量外,其他移民的数量都比较难以估计。虽然南方的许多地方在唐以前没有得充分的开发,但一般说来,南方仍然有相当数量的原住民,北方移民总要与南方土著发生接触,在语言上也要有所交融。除了在个别地区移民因为占绝对优势而使得移民方言有取代土著方言或语言的可能外,其他地方的移民方言就要与土著方言或语言在交融中发生变迁,这是问题的一方面,是应该由语言学来研究的问题。另一方面是唐代以前迁往南方的移民在文化方面要高于南方土著。无论生产方式、生活样态还是文化水平都是如此。因此他们所带来的方言也就具有一定的权威性,可能为当地土著所模仿,甚至成为他们的第二语言,就如同今日普通话的使用范围日益扩大,方言不断萎缩,汉语使用地域不断扩大,少数民族也将汉语作为第二语言一样。更进一步的发展,可能是土著放弃了他们原有的语言而改用移民语言,于是从方言认同看来,他们就是同属一个人群了,或曰同一个“民系”。但这只是推测而已,我希望遗传学者们能对这个问题加以深入的研究,将方言认同与血缘认同之间的关系弄明白。这一研究有很重要的意义,那就是我们不但可以了解文化认同的机能与程度究竟如何,而且还能从根本上探明北方移民的实际规模有多大。其实客家人在赣闽粤地区肯定同化了许多当时的少数民族,但只有从遗传学上的研究才能证明这一点,而且是数量方面的证明。如果可能,我希望历史学者、语言学者与遗传学者能携手从事这一研究。

(上接第 134 页)

#### 参考文献:

- [1] Morrison NA, Qi JC, Tokita A, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles[J]. *Nature*, 1994, 367(6460):284.
- [2] Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual* [M]. 3ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989:931.
- [3] Garnero P, Borel O, Sornay-Rendu E, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms do not predict bone turnover and bone mass in healthy premenopausal woman[J]. *J Bone Miner Res*, 1995, 10(9):1283.
- [4] Hustmyer FG, De Luca HF, Peacock M, Apa I, BsmI, EcoRV, and Tag I poly-morphisms at the human vitamin D receptor gene locus in Caucasians, Blacks and Asia[J]. *J Clin Invest*, 1994, 94(10):2130.
- [5] Yamagata Z, Miyamura T, Iijima S, et al. Vitamin D receptor gene polymorphism and bone mineral density in healthy Japanese women[J]. *Lancet*, 1994, 344(8928):1027.
- [6] Lim SK, Park YS, Park JM, et al. Lack of association between vitamin D receptor genotypes and osteoporosis in Koreans[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995, 80(12):3677.