

# 慢性肾衰竭继发性甲旁亢患者中 CaSR 基因 intron 5 多态性的研究

王洪磊<sup>1</sup> , 赵卫红<sup>2</sup> , 余多慰<sup>1</sup>

( 1. 南京师范大学生命科学学院 , 210097 , 江苏 , 南京 )

( 2. 南京医科大学第一附属医院 , 210029 , 江苏 , 南京 )

[ 摘要 ] 为研究中国江苏汉族人中钙敏感受体( calcium-sensing receptor , CaSR )基因单核苷酸多态性与慢性肾衰竭( chronic renal failure , CRF )继发性甲旁亢( secondary hyperparathyroidism , SHPT )的关系. 为此采集江苏省 122 例慢性肾衰竭继发性甲旁亢( CRF-SHPT )患者及 25 例正常人血液样本 , 通过 PCR-RFLP 的方法分析 CaSR 基因内含子 5( intron 5 ) BseR I 多态性 ; 以标准方法测定血清钙、血清磷、血清全段甲状旁腺素( intact PTH , iPTH ) 3 项生理指标 , 对检测的结果进行统计分析. 结果发现 , CRF-SHPT 患者 intron 5 多态性频率与正常人没有明显差异 , 汉族人 intron 5 多态性频率与其它种族有显著差异 ; TT 基因型患者的  $\text{Ca}^{2+}$ 、iPTH 的血清浓度显著低于 CC 基因型的浓度. 结论 : CaSR 基因 intron 5 多态性频率具有种族差异性 ; intron 5 多态性与  $\text{Ca}^{2+}$ 、iPTH 的血清水平密切相关 , 影响 CRF-SHPT 病情的严重程度.

[ 关键词 ] 钙敏感受体基因 , 慢性肾衰竭继发性甲旁亢 , 单核苷酸多态性

[ 中图分类号 ] Q812 , [ 文献标识码 ] A , [ 文章编号 ] 1001-4616( 2005 )01-0093-05

## Analysis of Intron 5 SNP of Calcium-sensing Receptor Gene in the CRF-SHPT Patients

Wang Honglei<sup>1</sup> , Zhao Weihong<sup>2</sup> , Yu Duowei<sup>1</sup>

( 1. School of Life Science , Nanjing Normal University , 210097 , Nanjing , China )

( 2. The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University , 210029 , Nanjing , China )

**Abstract** : In order to investigate the relationship between the polymorphism of calcium-sensing receptor ( CaSR ) gene and chronic renal failure - secondary hyperparathyroidism( CRF-SHPT ) in Chinese from Jiangsu province , we analyze the intron 5 single nucleotide polymorphism ( SNP ) of CaSR gene in 122 CRF-SHPT patients and 25 normal persons with PCR-RFLP , and assay the serum levels of calcium , phosphorus and intact PTH ( iPTH ) by standard methods. All the data are analyzed by statistical method. There is no significant difference between the CRF-SHPT patients and normal persons in genotypic frequency of intron 5. The genotypic frequency of intron 5 in the Han nationality is significantly different from that in other nationalities. The TT group shows significantly lower serum levels of intact PTH and  $\text{Ca}^{2+}$  than the CC group. Ethnic differences exist in the intron 5 polymorphism. The intron 5 polymorphism of CaSR gene are closely associated with the serum levels of PTH and calcium as well as the clinical severity CRF-SHPT patients.

**Key words** : Calcium-sensing receptor gene , CRF-SHPT , SNP

## 0 引言

继发性甲状旁腺功能亢进( SHPT )是慢性肾衰竭( CRF )的一个常见并发症 , 与多种遗传因素有关 , 如维生素 D 受体( VDR )基因的变化. 最近的研究表明钙敏感受体( CaSR )基因的突变对它有直接的影响.

收稿日期 : 2004-05-22.

基金项目 : 江苏省教育厅自然科学基金资助项目( 03KJB180064 ).

作者简介 : 王洪磊 , 1978 - , 硕士研究生 , 主要从事细胞生物学的学习与研究. E-mail : wang.henry@163.com

通讯联系人 : 余多慰 , 1954 - , 教授 , 主要从事分子与细胞生物学的教学与研究. E-mail : yuduowei@njnu.edu.cn

CaSR 是一种 G-蛋白耦联的七次跨膜受体,在甲状旁腺、肾小管、甲状腺 C 细胞等组织中大量表达<sup>[1,2]</sup>。许多研究表明, CaSR 可以感受到胞外钙离子微小变化,促进甲状旁腺素的分解,它对于调节甲状旁腺细胞的功能、甲状旁腺素的分泌、以及维持钙离子内环境稳定有重要作用<sup>[3]</sup>。在肾小管组织中, CaSR 能通过调节钙离子浓度来调节肾小管对二价阳离子的重吸收作用<sup>[4]</sup>。

CaSR 基因中已经发现的 30 多个突变中,大多为单碱基突变。这些微小的突变可能导致 CaSR 基因表达的变化、功能的缺陷或者增强,引起临床上相应的表现。CaSR 基因 intron 5<sup>[5,6]</sup>(最新命名出处见参考文献[6])长度约为 13.4 kb,在距离下游外显子 88 bp 处,有一个 T→C 的单碱基突变,是一个 T/C 单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)位点。国外有研究认为, intron 5 多态性影响 iPTH 及血清  $Ca^{2+}$  的浓度,对甲状旁腺功能亢进的严重程度有作用<sup>[6,7]</sup>,而国内对于 CaSR 基因多态性的研究不多。本文采用 PCR-RFLP 的方法研究汉族人中 CaSR 基因 intron 5 多态性,探讨这一多态性对汉族人慢性肾衰竭继发性甲旁亢(CRF-SHPT)的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象

江苏省 122 例汉族慢性肾衰竭甲状旁腺功能亢进(CRF-SHPT)患者,由江苏省人民医院提供。临床检测确定他们没有糖尿病并发症,因为糖尿病患者的 iPTH 指标偏低,可能影响分析,所以这样就避免了糖尿病对分析的影响。钙敏感受体基因型与血清 iPTH、 $Ca^{2+}$ 、P 之间的关系是在 122 例 CRF-SHPT 患者中,随机选取 60 例患者进行研究,年龄在 32~83 岁,其中女性 27 人。另外还对 25 例正常人做了 CaSR 基因 intron 5 BseR I 多态性基因型分析,具体生理生化指标未作分析。

### 1.2 生化指标测定

各项生理生化指标都是在透析 2 周前检测,保证测量的数据不受血液透析的影响。血清钙( $Ca^{2+}$ ,正常值 2.20~2.70 mmol/L)、血清磷(P,正常值 1.19±0.16 mmol/L)用自动生化分析仪(Olympus, AU800)测定;血清全段甲状旁腺素(iPTH,正常值 13~54 ng/L)采用放免法测定。

### 1.3 PCR-RFLP

#### 1.3.1 引物

CaSR 基因 intron 5 引物<sup>[6]</sup>由上海生工公司合成,序列为:

上游引物 5'—CAAGGACCTCTGGACCTCCCTTTGC—3',

下游引物 5'—GACCAAGCCCTGCACAGTGCCCAAG—3'。

#### 1.3.2 基因组 DNA 的提取

从外周血液中提取,采用细胞裂解液裂解,酚/氯仿抽提,乙醇沉淀的方法获得基因组 DNA。

#### 1.3.3 PCR 反应

使用 PTC—100™PCR 扩增仪(MJ Research, Inc),PCR 反应总体积 50 μL,其中 10×PCR buffer 5 μL, 25 mmol/L  $Mg^{2+}$  4 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 3 μL, Taq DNA 聚合酶 2U(0.4 μL),模板 2 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 1.5 μL。热循环条件:预变性 95℃ 5 min;之后进行 32 次循环,95℃ 变性 45 s,59℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 50 s,最后保温延伸 72℃ 7 min。

#### 1.3.4 酶切反应

PCR 产物 10 μL(约 100 ng),限制性内切酶 BseR I(NEW ENGLAND BioLabs)1 μL(10 U/μL),10×NEB buffer 2.0 μL,加水补至 20 μL 混合,65℃ 保温酶切 12 h。酶切产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,紫外灯下观察结果。存在 BseR I 酶切位点的等位基因以“C”表示,无 BseR I 酶切位点的以“T”表示。此外对酶切结果抽样进行了 DNA 测序检验确定无误(见图 1)。

其中, BseR I 酶切位点为 5'—GAGGAG(N)<sub>10</sub>▼—3'

3'—CTCCT(N)<sub>8</sub>▲—5'

“▲”、“▼”表示酶切位点,“—”表示多态性位点,此处来自一个 T→C 突变。

### 1.4 统计分析

观察的数据用平均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。组间比较采用方差分析、t 检验及卡方检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

异显著.

2 结果

2.1 钙敏感受体( CaSR )基因型的分布

根据 CaSR 基因 intron 5 有无 *BseR* I 酶切位点 ,其多态性定为 TT、CC、TC 3 种基因型( 见图 1、图 2 )正常人和患者 CaSR 基因型、等位基因频率见表 1.

表 1 CaSR 基因 intron 5 多态性的遗传分布

	基因型	基因型个体数	基因型频率/%	等位基因	等位基因数	等位基因频率/%
患者	TT	33	27. 05	T	117	47. 95
	TC	51	41. 80			
	CC	38	31. 15	C	127	52. 05
正常人	TT	6	24	T	23	46
	TC	11	44			
	CC	8	32	C	27	54



图 1 CaSR 基因 intron 5 PCR 产物测序图  
箭头上方是“T”等位基因,下方是“C”等位基因,  
表明 CaSR 基因 intron 5 有一个 T→C 的转换

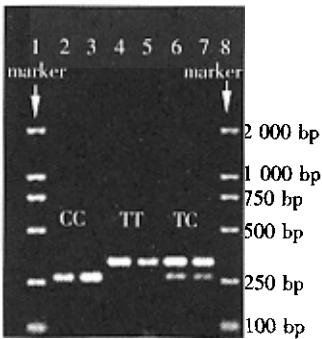


图 2 限制性内切酶 *BseR* I 消化 CaSR 基因 intron 5 PCR  
产物的电泳图

左起第 1、8 泳道为 DNA marker;第 2、3 泳道为 CC 基因型酶切结果,260 bp 和 60 bp( 本图不显示 60 bp 条带);第 4、5 泳道为 TT 基因型酶切结果,320 bp 条带;第 6、7 泳道为 TC 型基因酶切结果,形成 320 bp、260 bp、60 bp 三条带( 本图不显示 60 bp 条带)

应用软件 POPGENE( VERSION1. 31 )分析以上数据 ,两个群体都符合 Hardy – Weinberg 定律 ,正常人和患者的 intron 5 多态性频率也没有明显差异(  $p > 0. 05$  ). 另外通过该软件分析还发现 ,本文研究的汉族人的 intron 5 多态性频率与报道的其他种族的有显著差异 :Lovlie 等对挪威人的研究<sup>[ 5 ]</sup> ,Koishi 等对部分亚洲人种的研究 ,Shozo Yano 等在日本人中的研究结果都是 TT 基因型频率占优势<sup>[ 6、7 ]</sup> ,本文研究的汉族人中 ,TC 基因型的频率要占优势.

2.2 钙敏感受体基因型与血清 *iPTH*、 $Ca^{2+}$ 、P 之间的关系

在 122 例 CRF-SHPT 患者中 ,随机选取 60 例患者进行研究 ,资料见表 2.

表 2 不同基因型患者的年龄、性别、与临床生化指标

基因型/例数	CC( 20 )	TC( 24 )	TT( 16 )
年龄	56. 6 ± 17. 3	58. 1 ± 13. 6	60. 1 ± 14. 2
性别比( 女/男 )	8/12	11/13	8/8
<i>iPTH</i> /( ng/L )	291. 1 ± 190. 0	286. 3 ± 217. 0	181. 0 ± 138. 3
$M_{Ca^{2+}}$ /( mmol/L )	2. 39 ± 0. 29	2. 13 ± 0. 33	2. 14 ± 0. 27
$M_P$ /( mmol/L )	1. 99 ± 0. 41	1. 75 ± 0. 47	2. 20 ± 0. 98

分析表 2 资料 ,三种基因型的患者其年龄( 相当于发病时间 )差异不明显(  $p > 0. 05$  ),可以忽略年龄对各项生理指标的影响.

统计发现 ,所有患者的 *iPTH* 值都远高于正常值 ,这是 CRF-SHPT 的一个特征. TT 基因型的 *iPTH* 水平显著低于其它两种基因型的 *iPTH* 水平(  $p < 0. 05$  ) 见图 3. a ) ;CC 基因型的血清  $Ca^{2+}$  水平明显要高出其万方数据

他两个基因型( 见图 3. b ). 血清 P 水平在各基因型间没有显著的差异 ,TC 与 TT 基因型之间的差异最大 ,但差异并不显著(  $p > 0. 05$  )( 见图 3. c ).

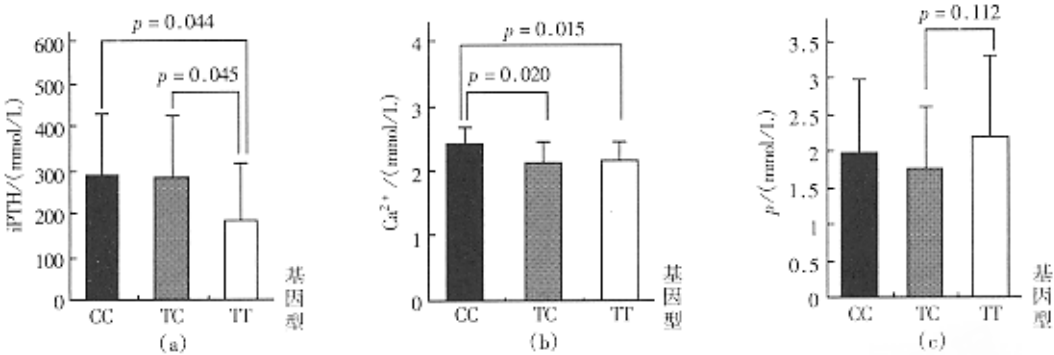


图 3 不同基因型患者生理生化指标的比较

为防止性别可能造成影响 ,本文对男性和女性分别作了分析 ,数据见表 3 ,对这些数据进行分析 ,得到和上述基本一致的结果即 CC 基因型的血清  $Ca^{2+}$  和 iPTH 水平高于 TT 基因型 . 另外 ,相同基因型的男性与女性比较 ,发现在 TT 基因型中女性的血清  $Ca^{2+}$  浓度(  $2. 02 \pm 0. 28$  mmol/L )显著低于男性(  $2. 25 \pm 0. 23$  mmol/L )(  $p = 0. 023$  ) ,CC 基因型中女性的血清  $Ca^{2+}$  浓度(  $2. 19 \pm 0. 21$  mmol/L )低于男性(  $2. 51 \pm 0. 26$  mmol/L )(  $p = 0. 052$  ) ,女性血清 P 也偏高于男性 .

另外 ,每种基因型的女性患者的平均年龄比男性患者要高 3 ~ 5 岁 . 这是否因为女性的发病时间晚 ,还是女性就诊时间晚 ? 条件所限 ,我们没有对这些患者进行调查 .

表 3 不同性别、不同基因型病人的临床生化指标

	CC 基因型		TC 基因型		TT 基因型	
	男( 12 )	女( 8 )	男( 13 )	女( 11 )	男( 8 )	女( 8 )
年龄	57 ± 19. 6	60. 8 ± 13. 4	56. 3 ± 13. 8	60. 2 ± 13. 7	55 ± 13. 2	65. 2 ± 14. 2
iPTH( ng/L )	295. 3 ± 198. 6	284. 8 ± 194. 6	266. 2 ± 166. 3	313. 1 ± 279. 8	181. 4 ± 173. 6	180. 5 ± 106. 4
$M_{Ca^{2+}}$ /( mmol/L )	2. 51 ± 0. 26	2. 19 ± 0. 21	2. 17 ± 0. 34	2. 09 ± 0. 35	2. 25 ± 0. 23	2. 02 ± 0. 28
MP/( mmol/L )	1. 98 ± 0. 44	2. 01 ± 0. 44	1. 67 ± 0. 28	1. 86 ± 0. 69	2. 07 ± 1. 03	2. 31 ± 1. 05

3 讨论

人类甲状旁腺 CaSR 基因定位于染色体 3q13. 3 - 21 上 ,其 cDNA 长度约 5. 4 kb<sup>[1 8]</sup> ,编码含 1 087 个氨基酸的蛋白质<sup>[2]</sup> ,它的一些微小突变都可能引起临床上的症状 . 例如 ,CaSR 的失活突变引起家族性良性低钙尿性高钙血症( Familial benign hypocalciuric hypercalcaemia ,FBHH ) ,新生儿严重甲状旁腺功能亢进( Neonatal severe hyperparathyroidism ,NSHPT )<sup>[3 9]</sup> ,CaSR 的功能获得性突变导致染色体显性低钙血症( autosomal dominant hypocalcium ,ADH )<sup>[3 10]</sup> ,在 FBHH/NSHPT 患者中 ,CaSR 功能的缺失导致钙调定点的升高 ,表现为血清  $Ca^{2+}$  水平升高的同时 iPTH 升高 ,尿钙水平降低 ,这些病理特征在 CaSR 基因敲除的小鼠中得到证实<sup>[8]</sup> .

CRF 患者吸收血清  $Ca^{2+}$  的功能大大降低 ,在病情较轻时 iPTH 的大量分泌对提高血清  $Ca^{2+}$  浓度有一定代偿作用 ,但严重的 CRF 患者这一代偿功能已不起多大作用 ,反而形成 iPTH 分泌过高的恶性情况 ,引起它的并发症继发性甲状旁腺功能亢进 . Shozo Yano 等研究了 CaSR 基因 intron 5 多态性对日本血透析患者的影响 ,认为 CaSR 基因多态性与 SHPT 的严重程度有关<sup>[6]</sup> . Mika Yamauchi 等研究认为 CaSR 基因 intron 5 多态性与原发性甲状旁腺功能亢进( Primary hyperparathyroidism ,pHPT )的严重程度相关<sup>[7]</sup> ,在这一点上本文对汉族人的研究结论与文献 6 结论基本一致 ,没有表现出种族差异 .

对江苏省汉族人的调查研究 ,发现正常人和 CRF-SHPT 患者的 intron 5 多态性基因型频率无显著差异 ,表明 intron 5 多态性不是引起 CRF-SHPT 的直接原因 . 但在对 CRF-SHPT 患者的研究中 ,发现 CC 基因型的 iPTH 和血清  $Ca^{2+}$  水平显著高于 TT 基因型 ,表明 intron 5 多态性与人体内 iPTH 密切相关 ,也即意味着 CaSR 基因多态性与 CRF-SHPT 的严重程度有关 . 从 iPTH 水平来看 ,CC 和 TC 基因型患者比 TT 基因型

患者病情严重,推断 C 等位基因的存在使 CRF-SHPT 患者病情更加严重。

CC 基因型的 CRF-SHPT 患者与 FBHH 患者情况相似,都显示出钙调定点的升高。FBHH 患者是由于 CaSR 基因外显子的突变引起 CaSR 活性的降低或者失活,从而引起临床上的症状。由此猜测, intron 5 C 等位基因可能影响转录过程中基因的剪接,或者因错误的剪接导致蛋白结构的错误,从而降低 CaSR 的活性,引起钙调定点的升高。CaSR 基因外显子纯和的失活突变可以引起 NSHPT 这一严重疾病,而 CC 基因型不会引起 NSHPT,推断 C 等位基因对 CaSR 的活性影响较小。这只是一个假设,至于这一内含子的多态性如何影响 CaSR 的活性还需要进一步研究。

本文的研究还发现了 intron 5 多态性基因型频率在种族中的差异。以往的研究发现在高加索人、日本人等样本中 CaSR 基因 intron 5 TT 基因型占优势<sup>[6,7]</sup>,曾一度认为这一多态性没有种族差异,但本研究发现汉族人中 TC 基因型群体占优势,所以可以认为 intron 5 多态性存在种族差异。

相同基因型的男性与女性患者相比较,男性的血清 Ca 水平显著高于女性的水平,而且女性的血清 P 水平有高于男性的趋势,提示女性 CRF-SHPT 的病情可能比男性的病情要严重一些。这一现象有可能是男女在生理条件上不同的原因所导致。另外联系女性患者比男性平均年龄高这一现象,推测也可能是由于女性患病后不及早就医,延误了治疗时间使病情恶化。当然这仅仅是推测,需要在有条件的情况下对患者进行专访来确定。由于条件所限,只对 60 例 CRF-SHPT 患者进行研究,这样的样本量足以说明我们所要研究的问题,但笔者同时认为,增加样本的数量,扩大研究范围,有利于找出 CaSR 基因多态性与一些疾病更加精确的相关性,这将有助于疾病的预防和诊治工作。另外 CRF-SHPT 与多种基因的变化有关,比如 VDR 基因 Bsm I 多态性就影响 SHPT 的严重程度<sup>[11]</sup>,因此也需要关注其它基因对 CRF-SHPT 的影响。

#### [ 参考文献 ]

- [ 1 ] Garrett J E , Capuano I V , Hammerland L G *et al.* Molecular cloning and functional expression of human parathyroid calcium receptor cDNAs [ J ]. *J Biol Chem* , 1995 , 270 ( 21 ) : 12919—12925.
- [ 2 ] Chattopadhyay N , Yamaguchi T , Brown E M.  $\text{Ca}^{2+}$ -receptor from brain to gut : common stimulus , diverse actions [ J ]. *Trends in Endocrinology and Metabolism* , 1998 , 9 ( 9 ) : 354—359.
- [ 3 ] Hendy G N , DSouza-Li L , Yang B , *et al.* Mutations of the calcium-sensing receptor ( CASR ) in familial hypocalciuric hypercalcemia , neonatal severe hyperparathyroidism , and autosomal dominant hypocalcemia [ J ]. *Hum Mutat.* 2000 , 16 ( 4 ) : 281—296.
- [ 4 ] Brown E M , Pollak M , Hebert. The extracellular , calcium-sensing receptor : its role in health and disease [ J ]. *Annual , Review of Medicine S C* , 1998 , 49 ( 1 ) : 15—29.
- [ 5 ] Lovlie R , Eiken HG , Sorheim J I , Boman HT.  $\text{Ca}^{2+}$ -sensing receptor gene ( PCAR1 ) mutation T151M in isolated autosomal dominant hypoparathyroidism [ J ]. *Hum Genet* , 1996 , 98 ( 2 ) : 129—133.
- [ 6 ] Shozo Y , Toshisugu S , Michiko K. *et al.* Association of polymorphic alleles of the Calcium-sensing receptor gene with parathyroid hormone secretion in hemodialysis patients [ J ]. *Nephron* 2000 , 85 ( 4 ) : 317—323.
- [ 7 ] Mika Y , Toshitsugu S , Toru Y , *et al.* Association of polymorphic alleles of the calcium sensing receptor gene with the clinical severity of primary hyperparathyroidism [ J ]. *Clinical Endocrinology* 2001 , 55 ( 3 ) : 373—379.
- [ 8 ] Ho C , Conner D A , Pollak M R , *et al.* A mouse model of human familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism [ J ]. *Nature Genetics* , 1995 , 11 ( 4 ) : 389—394.
- [ 9 ] Watanabe S , Fukumoto S. Familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism caused by inactivating mutations of calcium - sensing receptor [ J ]. *Nippon Rinsho* 2002 , 60 ( 2 ) : 325—330.
- [ 10 ] Watanabe T , Minagawa M. Familial hypoparathyroidism due to activating mutations in the calcium-sensing receptor gene [ J ]. *Nippon Rinsho* 2002 , 60 ( 2 ) : 331—337.
- [ 11 ] Elvira F , Joan F , Angels B , *et al.* Association between vitamin D receptor gene polymorphism and relative hypoparathyroidism in patients with chronic renal failure [ J ]. *J Am Soc Nephrol* , 1997 , 8 ( 10 ) : 1546—1552.

[ 责任编辑 孙德泉 ]