

· 综述 ·

维生素 D 受体基因的多态性与检测方法

游春华^{1,2} 熊筱娟² 王清华^{1,2} 陈万生¹ 高守红¹ (1. 第二军医大学附属长征医院药学部,上海 200003; 2. 宜春学院化学与生物工程学院,江西 宜春 336000)

[摘要] 近年研究发现,维生素 D 缺乏除与骨软化相关外,还与高血压、糖尿病、代谢综合征等多种疾病相关。维生素 D 在体内经肝脏和肾脏两次羟基化后作用于其受体而发挥生理作用。笔者通过查阅国内外相关文献,介绍维生素 D 与疾病的关系及维生素 D 受体基因多态性研究现状,阐述检测维生素 D 常用方法的优缺点,提出检测维生素 D 的最佳方法及其受体基因多态性检测的重要性,从而指导临床医生合理用药。

[关键词] 维生素 D; 基因多态性; 维生素 D 受体; 合理用药

[中图分类号] R977.2⁺⁴ **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2014)05-0329-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2014.05.003

Study on receptor gene polymorphism and detection method of vitamin D

YOU Chunhua^{1,2}, XIONG Xiaojuan², WANG Qinghua^{1,2}, CHEN Wansheng¹, GAO Shouhong¹ (1. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital Affiliated to Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Yichun University, College of Chemistry and Bio-engineering, Yichun 336000, China)

[Abstract] In recent years, many studies have found that vitamin D insufficiency is associated with osteomalacia, hypertension, diabetes, metabolic syndrome and other diseases. Vitamin D must be hydroxylated in the liver by a 25-hydroxylase for the first time, and then in the kidney by a 1 α -hydroxylase for the second time to form the active metabolite 1,25-dihydroxy vitamin D, which binds to the intracellular vitamin D receptor and exerts its effects. This paper reviewed the relationship between vitamin D and disease, present research situation of gene polymorphism of vitamin D receptor, and the advantages and limitations of several methods of vitamin D detection, and proposed the best method for detecting vitamin D receptor gene polymorphism and the importance of the detection state to guide clinicians to use drug rationally.

[Key words] vitamin D; gene polymorphism; vitamin D receptor; rational drug use

维生素 D (Vit D) 为人体自身不能合成的必需营养素,需要通过日光照射或食物摄入获得补充^[1]。维生素 D 只有在体内经肝脏 25 羟化酶和肾脏 25 羟维生素 D [25(OH)D]-1 α -羟化酶作用下转化为有活性的 1,25-二羟基维生素 D₃ [1,25-(OH)₂D₃],才能最大程度地激活 Vit D 受体 (VDR),发挥其生理作用^[2]。

Vit D 在人体正常生理或生化功能方面起着至关重要的作用。Vit D 缺乏症在普通人群中的患病率已经成为一个重大的公共卫生问题, Vit D 缺乏不仅与骨骼、肌肉疾病相关,还与免疫系统、肿瘤、糖尿病、肾脏、呼吸系统、神经精神等疾病相关。研究发现 Vit D 受体基因多态性会影响到 Vit D 的作用,可见 Vit D

与人类健康关系密切,在健康人群及患者中检测 Vit D 水平是很有必要的。25(OH)D 已被公认为检测 Vit D 水平的主要指标。一般认为, Vit D 缺乏的标准是血浆中 25(OH)D 浓度小于 30 ng/ml,而大于 100 ng/ml 时会引起中毒^[3]。目前检测 25(OH)D 水平的方法各有优缺点,国内外对 Vit D 受体基因多态性报道不多,笔者通过查阅大量国内外有关文献,介绍几种检测方法的利弊和 Vit D 受体基因多态性与疾病的关系,了解患者 Vit D 水平及 Vit D 受体基因变化情况的关系,从而指导临床医生合理用药。

1 Vit D 与疾病的关系

研究表明, Vit D 受体存在于人体各细胞中,包括骨骼肌细胞之外的免疫细胞、肿瘤细胞、心肌细胞等。Vit D 与疾病的关系见表 1。

在世界范围内 Vit D 缺乏已普遍存在,随着 Vit D 与疾病的关系建立,凸显了 Vit D 水平与健康关系的密切性。

[作者简介] 游春华,硕士研究生。Tel: 15801805171, E-mail: youchunhua0808@126.com.

[通讯作者] 高守红。Tel: 13818129949, E-mail: gaoshouhong@126.com.

表1 Vit D 与疾病的关系^[4]

疾病	Vit D 在疾病中的作用
骨骼、肌肉疾病	调节钙磷代谢,促进肠内钙磷吸收和骨质钙化,维持血钙和血磷平衡
免疫系统疾病	影响免疫系统的调控,疾病中可以活化巨噬细胞
肾脏疾病	保护肾小球系膜细胞和足细胞,减少蛋白尿等
糖尿病	促使胰岛B细胞产生、分泌更多胰岛素,抑制胰岛细胞凋亡,改善胰岛素敏感性,改善胰岛素抵抗
心血管疾病	调控心肌活动,抑制血管平滑肌增殖,抑制RAS系统等

2 Vit D 受体基因多态性研究现状

目前发现 Vit D 代谢产物 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 可能负责调控个体生长发育及人类疾病相关的 200 多个基因^[5], 基因多态性分别对应限制性内切酶 Bsm I (位于第 8 内含子上)、Apa I (位于第 8 内含子上)、Taq I (位于第 9 外显子上)、Fok I (位于第 2 外显子上) 的酶切位点。国内外相关研究报道如下:

2.1 Bsm I 位点 Ji 等^[6]的分析表明, Bsm I BB 基因型和骨折之间在统计上有着显著的关联。Diego 等^[7]在研究 VDR 基因多态性对圣迭哥和智利 1 型糖尿病患儿的免疫应答的影响时,发现 VDR 基因 (Bsm I) 多态性和 1 型糖尿病有关。Zhang 等^[8]研究 Vit D 受体基因 Bsm I 多态性与中国汉族人群 2 型糖尿病肾病时得出结论, Vit D 受体等位基因 B (BB 或 Bb 基因型) 与汉族 2 型糖尿病患者大量蛋白尿有关,可能是早发糖尿病肾病的危险因素。Sara 等^[9]研究唐氏综合征患者 Vit D 受体基因多态性时发现 VDR 基因 Bsm I 多态性的等位基因 B 在唐氏综合征患者中出现更频繁。bb 和 BB 基因型分别更频繁地出现在高个和寿命长的唐氏综合征患者中。这个结果指出 VDR 基因型可能会影响唐氏综合征患者的这两个表型特征。

2.2 Apa I 位点 Daisuke 等^[10]研究结果显示, VDR 基因 Apa I 多态性与患人类 T 淋巴细胞白血病病毒 I 型 (HTLV-I) 相关性脊髓病/热带痉挛性瘫痪 (HAM/TSP) 的风险有关,但这种基因多态性并不影响 HTLV-I 原病毒在 HAM/TSP 患者和 HTLV-I 血清阳性携带者 (HCs) 中的负荷。Elisabeth 等^[11]研究结果显示,在患多囊卵巢综合征 (PCOS) 的妇女中, VDR 基因 Apa I AA 基因型与其低水平雄性激素有关。

2.3 Taq I 位点 Yiannis 等^[12]在研究 VDR Taq I 基因多态性与希腊的人口肥胖相关性时,发现 VDR Taq I 等位基因 T 与肥胖有关,并建议在更大规模的独立群体中验证这一发现。Martelli 等^[13]研究在意大利人口中 VDR Taq I 多态性与慢性牙周炎的关联时表明在意大利人口中 VDR Taq I 多态性差异与慢

性牙周炎和侵袭性牙周炎的发生与发展有关。对 VDR 基因多态性的研究可能会成为预防牙周炎及植入评估中必不可少的环节。

2.4 Fok I 位点 Syed 等^[14]研究结果表明,克什米尔人多发性骨髓瘤与 Fok I 基因多态性有关,ff 基因型与发展中的多发性骨髓瘤的风险性有关。

国内外研究结果显示, VDR 基因多态性除与骨骼效应有关外,还与骨髓瘤、糖尿病、肥胖、牙周炎、前列腺癌等多种疾病之间存在相关性。然而在我国对 VDR 基因多态性相关研究较少,为此很有必要开展 VDR 基因多态性与疾病关系的相关研究。

3 $25(\text{OH})\text{D}$ 水平检测方法概述

3.1 放射免疫分析法 放射免疫分析法 (RIA) 是一种利用同位素标记的与未标记的抗原同抗体发生竞争性抑制反应的放射性同位素体外微量分析法,几乎能应用于所有激素的分析(包括多肽类和固醇类激素)。于媛等^[15]采用放射性免疫法检测 82 例慢性肾病 (CKD) 患者 3~5 期非透析患者的血浆 $25(\text{OH})\text{D}$ 与 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 水平,发现 CKD 患者 3~5 期非透析患者普遍存在 $25(\text{OH})\text{D}$ 与 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 缺乏。沈波等^[16]选择复旦大学附属中山医院血液净化中心维持性透析患者 224 例,采用放射免疫测定试剂盒检测 $25(\text{OH})\text{D}$,结果发现血液透析人群中 $25(\text{OH})\text{D}$ 缺乏十分常见,且可能与心脏疾病、炎症、贫血的发生与发展相关。但它的不足之处在于:检测过程中容易产生放射性污染,对人体有损害,且操作烦琐,精确度相对较低,因此在临床应用上受到一定限制^[17]。

3.2 酶免疫分析法 酶免疫分析法 (ELISA) 是一种非放射性标记免疫分析技术,以酶标记抗原或抗体作为示踪物,由高活性的酶催化底物显色或发光,达到定量分析的目的,是早期 Vit D 测定的主流方法,该法操作简单,节省人力。谷丽娟等^[18]采用 ELISA 法测定 48 个不同严重程度 2 型糖尿病肾病患者的血清 $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 水平,发现 $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 可能与 2 型糖尿病肾病相关,并且能够在一定程度上反映其严重程度。闻萍等^[19]选取南京医科大学第二附属医院肾脏病中心 278 例维持性血液透析 (MHD) 患者,采用 ELISA 方法检测患者血清 $25(\text{OH})\text{D}$ 的水平,并用多元回归分析法分析 $25(\text{OH})\text{D}$ 水平与患者临床指标间的相关性,结果发现 Vit D 缺乏和不足在 MHD 患者中发生率十分高,女性及心血管并发症的发生与之密切相关。李芬等^[20]选择 43 例透析时间 > 3 个月、病情稳定、已排除急性心血管事件的血液透析患者 (MHD 组),采

用 ELISA 法测定 25(OH)D 水平 结果发现 MHD 患者 Vit D 缺乏的患病率较肾功能正常组明显增高。但 ELISA 法对基质效应敏感,容易与其他非目标化合物产生交叉反应,当患者服用维生素 D₂ 补充剂治疗 Vit D 缺乏时 酶法测定结果偏低,可能误导临床决策,带来 Vit D 中毒风险^[21]。

3.3 化学发光免疫分析法 化学发光免疫分析 (CLIA) 是将化学发光测定技术与免疫反应相结合的检测分析技术,该法具有高灵敏度、高特异性、操作简单、自动化等优点。单咏梅等^[22] 依据美国临床和实验室标准化协会 (CLSI) 相关规定对 LIAISON 全自动化学发光仪测定 25(OH)D 的检测性能验证与评估 结果表明 LIAISON 全自动化学发光仪测定 25(OH)D 在精密度、分析灵敏度、功能灵敏度、线性范围、临床可报告范围等性能参数上均符合要求,可以应用于临床检测。Leino 等^[23] 采用罗氏 E170 化学免疫分析法与其他方法测定 25(OH)D 时,发现 CLIA 法与 LC-MS/MS、RIA 法测得的浓度相当吻合,但 CLIA 法在低浓度范围分析灵敏度不高。

3.4 LC-MS/MS 检测法 LC-MS/MS 符合现代临床实验室的工作流程,可完全满足临床检测方法准确性、特异性、检测通量的要求。LC-MS/MS 法既能测定 25(OH)D 总量,又能检测 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃,具有非常高的检测特异性,且与维生素 D 代谢产物的质量评估方案 [DEQAS] 相吻合^[24],被认为是“金标准”的检测技术。Higashi 等^[25] 报道用 LC-MS/MS 法非侵害性地测定了唾液中 25(OH)D 水平及服用 Vit D 后唾液中 25(OH)D 增加水平,这种方法已成功用于临床研究。此外,LC-MS/MS 的试剂用量少,可实现多成分同时检测。Mochizuki 等^[26] 用 LC-MS/MS 法同时检测血浆中 25(OH)D₂ 和 25(OH)D₃,实验只用了 25 μl 血浆,并预测这种高通量检测法用于临床评价 Vit D 水平很有潜力。Guo 等^[27] 用 LC-MS/MS 法定量测定血浆中包括 25(OH)D 在内的 12 种类固醇,充分显示此法在临床的应用价值。上述 4 种检测 Vit D 方法的优缺点比较详见表 2。

4 展望

Vit D 缺乏已是一个全球性问题,我国人群 Vit D 水平也普遍偏低。Vit D 缺乏除与骨骼效应有关外,还与非骨骼效应多种疾病相关联,如高血压、外周血管疾病、糖尿病、代谢综合征、冠脉疾病等。但 Vit D 缺乏患者的症状并不明显,难以发现,同时研究发现 Vit D 服用过多也会对人体造成相应的伤害,为此建立一种稳定、准确、灵敏的方法测定 25

(OH)D 是很有必要的。目前,临床常用的方法测定 25(OH)D 常常出现不灵敏、准确度不高、个体间存在差异等问题。LC-MS/MS 测定 Vit D 及代谢产物有望逐步发展成为临床上测量 Vit D 的最佳方法,为临床上尽早发现 Vit D 缺乏以及提醒患者及时补充 Vit D 具有实际的指导意义。

表 2 4 种不同检测 Vit D 方法的优缺点比较^[24-28-30]

方法	优点	缺点
RIA	灵敏度高,特异性强,不受周围环境的影响,完善的放射测量体系	易产生放射性污染,精确度不高,操作烦琐
ELISA	成本低,操作简单,检测时间短	灵敏度低,稳定性低,可靠性低,基质效应敏感
CLIA	线性范围宽,所需时间短,可靠性高,容易自动化	低浓度灵敏度不高,基质效应敏感
LC-MS/MS	灵敏度高,特异性强,可靠性高,精确度高,同时进行多成分分析	仪器成本高

Vit D 受体基因多态性在阐明人体对疾病、毒物的易感性与耐受性、疾病临床表现的多样性以及对药物治疗的反应性上起到重要作用。为此通过研究 Vit D 受体基因多态性,可以了解个体对药物代谢的差异,结合 Vit D 水平,建立人体 Vit D 水平与 Vit D 受体基因多态性之间关系,从而更好地指导临床医生合理用药,最终达到个体化用药的目的。

【参考文献】

- [1] Jungert A, Neuhäuser-Berthold M. Dietary vitamin D intake is not associated with 25-hydroxyvitamin D₃ or parathyroid hormone in elderly subjects, whereas the calcium-to-phosphate ratio affects parathyroid hormone [J]. *Nutr Res*, 2013 (33): 661-667.
- [2] Chiu YE, Havens PL, Siegel DH, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D concentration does not correlate with atopic dermatitis severity [J]. *J AM ACAD Dermatol*, 2013 69(1): 40-46.
- [3] Souberielle JC, Body JJ, Lappe JM, et al. Vitamin D and musculoskeletal health, cardiovascular disease, autoimmunity and cancer: recommendations for clinical practice [J]. *Autoimm Rev*, 2010 (9): 709-715.
- [4] 毕晓娜, 衣明纪. 维生素 D 缺乏与临床疾病 [J]. *青岛大学医学院学报* 2011 47(3): 280-282.
- [5] Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an endocrine society clinical practice guideline [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011 96(7): 1911-1930.
- [6] Ji GR, Yao M, Sun CY, et al. BsmI, TaqI, ApaI and FokI polymorphisms in the vitamin D receptor (VDR) gene and risk of fracture in caucasians: a meta-analysis [J]. *Bone*, 2010 (47): 681-686.

(下转第 392 页)

- 2011: 102-103.
- [4] Herbrecht R , Denning DW , Patterson TF , *et al.* Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis [J]. *New Engl J Med* ,2002 ,347: 408-415.
- [5] 许改香,童茵,毛莉萍.两性霉素B治疗56例恶性血液病患者真菌感染的临床分析[J].*中国实用医药*,2008,3(26):117-119.
- [6] Stefan W , David F , Roisin MF , *et al.* human tissue distribution of voriconazole [J]. *Antimicrob Agents Chemother* , 2011 , 55 (2) : 925-928.
- [7] 徐翔.注射药物相容性手册(1):抗菌药物分册[M].杭州:西泠印社出版社,2005:34-42.
- [8] 中华医学会糖尿病学分会.中国2型糖尿病防治指南(2010年版)[J].*中国糖尿病杂志*,2012,20(1):S1-S36.
- [9] Kahn CR , Weir GC , King GL , *et al.* /潘长玉主译. *Joslin 糖尿病学* [M]. 14 版. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 683-685, 771.
- [10] 蔡卫民.我国医院药学面临的机遇与挑战[J].*中国医院药学杂志*,2005,25(5):471-472.
- [收稿日期] 2013-07-31 [修回日期] 2013-11-21
[本文编辑] 陈静
- (上接第331页)
- [7] Diego G , Barbara A , Francisco PB , *et al.* VDR polymorphisms influence the immune response in type I diabetic children from Santiago , Chile [J]. *Diabetes Res Clin Pract* , 2007 , 77 (1) : 134-140.
- [8] Zhang H , Wang JW , Yi B , *et al.* BsmI polymorphisms in vitamin D receptor gene are associated with diabetic nephropathy in type 2 diabetes in the Han Chinese population [J]. *Gene* , 2012 , (495) : 183-188.
- [9] Sara Panizo G , Eva Parisi C , Jose Manuel Valdivielso R , *et al.* Vitamin D receptor gene polymorphisms in persons with Down's syndrome [J]. *International Medical Journal on Down Syndrome* , 2006 , 10 (1) : 2-7.
- [10] Saito M , Eiraku N , Usuku K , *et al.* ApaI polymorphism of vitamin D receptor gene is associated with susceptibility to HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in HTLV-1 infected individuals [J]. *J Neurol Sci* , 2005 (232) : 29-35.
- [11] Wehr E , Trummer O , Giuliani , *et al.* Vitamin D-associated polymorphisms are related to insulin resistance and vitamin D deficiency in polycystic ovary syndrome [J]. *Eur J Endocrinol* , 2011 (164) : 741-749.
- [12] Yiannis V , Theologia S , Maria P , *et al.* VDR TaqI is associated with obesity in the Greek population [J]. *Gene* , 2013 (513) : 237-239.
- [13] Martelli FS , Mengoni A , Rosati C , *et al.* VDR TaqI polymorphism is associated with chronic periodontitis in Italian population [J]. *Arch Oral Biol* , 2011 (56) : 1494-1498.
- [14] Syed S , Iqbal Q , Zafar AS , *et al.* Role of vitamin D receptor (VDR) polymorphisms in susceptibility to multiple myeloma in ethnic Kashmiri population [J]. *Blood Cells , Mol Dis* , 2013 , (51) : 56-60.
- [15] 于媛,王宓,王梅.慢性肾脏病3~5期非透析患者25(OH)D与1,25(OH)2D水平的相关性及影响因素[J].*中国血液净化*,2011,10(6):310-314.
- [16] 沈波,张立元,邹建.血液透析患者血清25-羟维生素D[25(OH)D]水平及相关因素研究[J].*复旦学报*,2012,39(2):135-140.
- [17] 闫永杰.电化学发光法与放射免疫法检测血清甲状腺素的方法学比较[J].*中国医学装备* 2013,10(5):88-90.
- [18] 谷丽娟,刘健萍.2型糖尿病肾病患者血清1,25-二羟维生素D₃与肾功能指标的相关性研究[J].*山东医药*,2012,52(33):15-17.
- [19] 闻萍,叶红,武晓春.维持性血液透析患者维生素D缺乏的调查[J].*肾脏病与透析肾移植杂志*,2012,21(2):139-144.
- [20] 李芬,辛克明,邢昌赢.维生素D缺乏与维持性血液透析患者心脏功能的关[J].*江苏医药* 2011,37(21):2524-2526.
- [21] 李水军,周建烈,余琛.维生素D代谢及25-羟基维生素D测定方法研究进展[J].*国际检验医学杂志*,2012,33(24):3028-3029.
- [22] 单咏梅,杨凡,万海英. LIAISON全自动化学发光仪测定25-羟基维生素D分析性能评估[J].*国际检验医学杂志*,2012,33(10):1252-1253.
- [23] Leino A , Turpeinen U , Koskinen P. Automated measurement of 25-OH vitamin D₃ on the Roche Modular E170 Analyzer [J]. *Clin Chem* , 2008 , 54 (12) : 2059-2062.
- [24] Clarke MW , Tuckey RC , Gorman S , *et al.* Optimized 25-hydroxyvitamin D analysis using liquid-liquid extraction with 2D separation with LC/MS/MS detection , provides superior precision compared to conventional assays [J]. *Metabolomics* , 2013 (9) : 1031-1040.
- [25] Higashi T , Shibayama Y , Fuji M , *et al.* Liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the determination of salivary 25-hydroxyvitamin D₃: a noninvasive tool for the assessment of vitamin D status [J]. *Anal Bioanal Chem* , 2008 , 391 (1) : 229-238.
- [26] Mochizuki A , Kodera Y , Saito T , *et al.* Preanalytical evaluation of serum 25-hydroxyvitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₂ measurements using LC-MS/MS [J]. *Clin Chim Acta* , 2013 (420) : 114-120.
- [27] Guo T , Taylor RL , Singh RJ , *et al.* Simultaneous determination of 12 steroids by isotope dilution liquid chromatography-photo-spray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Clin Chim Acta* , 2006 , 372 (1-2) : 76-82.
- [28] 郭辉.化学发光免疫分析法与酶联免疫法测定乙肝病毒标志物的相关性分析[J].*中国伤残医学*,2013,21(5):270-271.
- [29] 毛茅,钱晓萍.免疫分析法在体内药物分析中的应用[J].*海峡药学*,2007,19(7):93-96.
- [30] Couchman L , Benton CM , Moniz CF. Variability in the analysis of 25-hydroxyvitamin D by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: the devil is in the detail [J]. *Clin Chim Acta* , 2012 (413) : 1239-1243.
- [收稿日期] 2013-12-20 [修回日期] 2014-04-26
[本文编辑] 陈静