

维生素 D 受体基因多态性与吸烟人群慢性阻塞性肺疾病易感性研究



扫码阅读电子版

张平 朱应群 李喆 范杜 何龙培

长沙市第三医院呼吸内科 410015

通信作者: 朱应群, Email: 1104633835@qq.com

【摘要】 目的 探讨长沙地区汉族吸烟人群中维生素 D 受体 (VDR) 基因多态性与慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 易感性的关系。方法 针对长沙地区汉族吸烟人群, 共收集 50 例在长沙市第三医院呼吸内科门诊就诊的有吸烟史的 COPD 稳定期患者, 设为吸烟 COPD 组; 同时收集 50 例在同院同期体检中心体检的吸烟健康者, 设为吸烟对照组。采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 法检测 VDR 基因多态位点 Apa I、Bsm I 以及 Taq I 的基因型, 探讨 VDR 基因多态性与 COPD 易感性的关系。结果 吸烟 COPD 组与吸烟对照组之间 Apa I 位点的 aa、Aa、AA 基因型频率分布差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。以 Aa+AA 基因型做参照, 携带 aa 基因型可能增加吸烟人群 COPD 的发病风险 ($OR = 2.786$, 95% $CI : 1.215 \sim 6.389$)。2 组的 a、A 等位基因频率分布差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且与携带等位基因 A 相比, 携带等位基因 a 的个体可能增加吸烟人群 COPD 的发病风险 ($OR = 1.897$, 95% $CI : 1.042 \sim 3.457$)。2 组 Bsm I 与 Taq I 位点的基因型频率分布差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 Apa I 的基因多态性可能增加吸烟人群 COPD 的易感性, 而 Bsm I 以及 Taq I 位点多态性可能与吸烟人群 COPD 的易感性无关联。

【关键词】 肺疾病, 慢性阻塞性; 维生素 D 受体; 多态性; 吸烟人群

基金项目: 湖南省卫生计生委科研项目计划课题项目 (B2016165)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2019.02.003

Vitamin D gene polymorphism with susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease in smokers

Zhang Ping, Zhu Yingqun, Li Zhe, Fan Du, He Longpei

Department of Respiratory Medicine, the Third Hospital of Changsha, Changsha 410015, China

Corresponding author: Zhu Yingqun, Email: 1104633835@qq.com

【Abstract】 **Objective** To detect the correlations between polymorphisms of vitamin D receptor (VDR) genes and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in smokers. **Methods** Fifty smoking COPD patients and fifty smoking volunteers were enrolled in the study. Polymorphisms of VDR genes including Apa I, Bsm I and Taq I were detected by using polymerase chain reaction-restriction fragments length polymorphism (PCR-RFLP). Correlations between VDR gene polymorphisms and the susceptibility to COPD in smokers were analyzed. **Results** There was a statistically significant difference in the frequency distributions of aa, Aa and AA genotypes between the smoking COPD group and the smoking control group ($P < 0.05$). Using the Aa+AA genotype as a reference, individuals carrying the aa genotype increased the risk of COPD in smokers ($OR = 2.786$, 95% $CI : 1.215 \sim 6.389$). There was a statistically significant difference in the frequency distributions of a and A alleles between the two groups ($P < 0.05$). Compared with carrying allele A, individuals carrying allele a increased the risk of COPD in smokers ($OR = 1.897$, 95% $CI : 1.042 \sim 3.457$). There was no statistically significant difference in genotype frequency distribution of Bsm I and Taq I between the two groups. **Conclusions** Apa I gene polymorphism may increase the susceptibility of COPD in smokers, while Bsm I and Taq I gene polymorphisms may not be associated with the susceptibility of COPD in smokers.

【Key words】 Pulmonary disease, chronic obstructive; Vitamin D receptor; Polymorphism;

Smokers

Fund program: Scientific Research Project of Hunan Provincial Health and Family Planning

Commission (B2016165)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2019.02.003

COPD 是一种以持续性呼吸道症状和气流受限为特征的常见呼吸系统疾病,常与暴露于有毒颗粒或气体后引起的气道和/或肺泡异常有关。COPD 在全世界范围内有着高发病率和 high 病死率,虽然 COPD 可防可治,但目前尚无药物或治疗方法逆转 COPD 患者肺功能进行性下降,因此如何防治 COPD 一直是难点。COPD 的发病机制尚不明确,一般认为主要受遗传基因和环境因素两方面的影响。吸烟是 COPD 目前公认的最常见的危险致病因素。目前认为 COPD 可能是一种多基因遗传性疾病,因此寻找 COPD 的易感基因是目前研究的热点。目前发现维生素 D 与 COPD 的发病机制存在关联^[1]。维生素 D 受体 (vitamin D receptor, VDR) 是维生素 D 代谢途径中的关键位点, VDR 基因可作为 COPD 研究的候选易感基因。本研究选择目前研究较多的 3 个 VDR 基因多态位点 Apa I、Bsm I 以及 Taq I,探讨 VDR 基因多态性与吸烟人群 COPD 易感性的关系,以进一步探求 VDR 在 COPD 发生、发展过程中的具体潜在机制。

1 对象与方法

1.1 研究对象 本研究采用病例对照研究。研究对象收集时间为 2016 年 1 月至 2016 年 12 月,针对长沙地区汉族吸烟人群,共收集 50 例在长沙市第三医院呼吸内科门诊就诊的有吸烟史的 COPD 稳定期患者,设为吸烟 COPD 组;同时收集 50 例在同院同期体检中心体检的吸烟健康者,设为吸烟对照组。入选标准:(1)吸烟 COPD 组须符合中国《慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013 年修订版)》中的 COPD 诊断标准^[2]:即有呼吸困难、慢性咳嗽或多痰;有危险因素暴露史;吸入支气管扩张药之后行肺功能检查示第 1 秒用力呼气容积 (forced expiratory volume in one second, FEV₁)/FVC<0.70;(2)所有研究对象经肺功能检查、X 线胸片或胸部 CT 等检查证实无支气管哮喘、充血性心力衰竭、支气管扩张、肺结核、弥漫性泛细支气管炎等疾病史;(3)对照组除无上述疾病外,无 COPD 病史;(4)肝肾功能正常。本研究吸烟人群纳入标准为吸烟严重程度指数 ≥ 2 分者^[3]。本研究经长沙市第三医院伦理委员会批准 (2016EC-002),所有研究对象均经充分知情后签

署知情同意书。

1.2 临床资料的收集 收集所有研究对象的一般资料:包括性别、年龄、居住地、民族、危险因素接触史(包括吸烟史和职业史等)、既往史、家族史等;并同时收集临床资料:包括症状、体征、X 线胸片或胸部 CT 等。对所有研究对象测量身高、体质量,并计算体质量指数。体质量指数 = 体质量/身高² (kg/m²)。所有研究对象休息 30 min 后在专业做肺功能检查的医师指导下测定肺功能,检测 FEV₁%pred、FEV₁/FVC 等指标。

1.3 研究方法

1.3.1 血样的采集与 DNA 的提取 所有研究对象于清晨空腹抽取静脉血 4 ml,选用北京天根生化科技有限公司提供的 DNA 提取试剂盒提取人白细胞基因组 DNA。

1.3.2 VDR 基因分型 本研究采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 法。由于 Apa I 和 Taq I 位于同一扩增片段上,因此 VDR 这 2 个多态位点可共用一对引物:上游引物为 5'-CTAAATGCACGGAGAAGTCACTG-3',下游引物为 5'-TTCTGGATCATCTTGGCATAGAG-3'。Bsm I 的上游引物为 5'-ATAAGGAAATACCTA-CTTTGCTGG-3',下游引物为 5'-CGCAAGAAA-CCTCAAATAACAGCG-3'。PCR 反应条件为预变性 95 °C 5 min,变性 95 °C 30 s,退火 58 °C 45 s,延伸 72 °C 60 s,共计 30 个循环。最后,72 °C 终止延伸 6 min。PCR 扩增后,应用限制性内切酶 (立陶宛 Fermentas 公司) 酶切,然后对酶切产物电泳。

1.4 结果判断 目的片段产物经 Apa I、Bsm I 或 Taq I 限制性内切酶酶切后电泳条带可能出现 3 种情况:(1)等位基因没有酶切位点的纯合子出现 1 个条带,分别以 2 个对应内切酶的第一个大写字母表示其基因型 (AA、BB 或 TT);(2)只有一个酶切位点的杂合子出现 3 个条带,分别以对应内切酶的第一个大小写字母表示其基因型 (Aa、Bb 或 Tt);(3)有 2 个酶切位点的纯合子出现 2 个条带,分别以 2 个对应内切酶的第 1 个小写字母表示其基因型 (aa、bb 或 tt)。

1.5 统计学分析 数据分析应用 SPSS 21.0 统计

软件进行。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，吸烟 COPD 组与吸烟对照组间的计量资料比较采用 t 检验。计数资料以例数表示。基因频率采用基因计数法计算。基因型分布及组间等位基因频率的差异比较采用 χ^2 检验。分析各基因型与 COPD 发病风险的关联以计算比值比 (odds ratio, OR) 及其 95% 的置信区间 (confidence interval, CI) 表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组间一般资料的比较 吸烟 COPD 组与吸烟对照组在性别构成、年龄、体质量指数方面差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，见表 1。

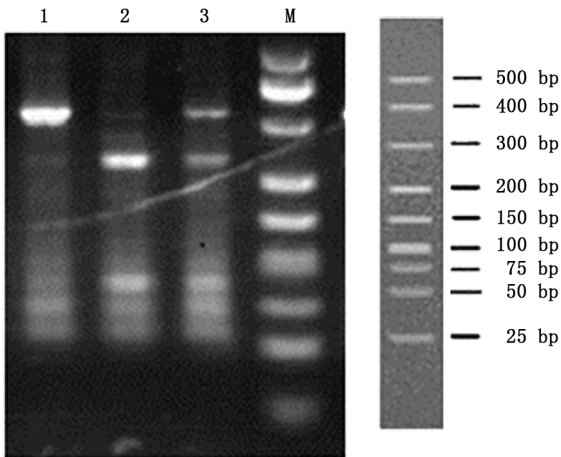
表 1 2 组研究对象一般资料的比较

组别	例数	性别 (例)		年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	体质量指数 ($\text{kg}/\text{m}^2, \bar{x} \pm s$)
		男	女		
吸烟对照组	50	38	12	60.37±10.51	22.17±3.27
吸烟 COPD 组	50	40	10	62.05±10.79	20.46±3.05
统计值		$\chi^2 = 0.233$		$t = 0.602$	0.591
P 值		0.810		0.551	0.598

吸烟严重度指数方面，吸烟 COPD 组为 (2.26±0.44) 分，吸烟对照组为 (2.76±0.47) 分，两者差异有统计学意义 ($t = 2.409, P = 0.021$)。

依据 GOLD 2018 修订的 COPD 综合评估工具^[4]，COPD 组综合评估分布情况为：A 组为 11 例，B 组为 33 例，C 组为 6 例。

2.2 酶切后电泳结果 Apa I、Bsm I 和 Taq I 的各基因型的条带数目及位置分别见图 1、2、3。

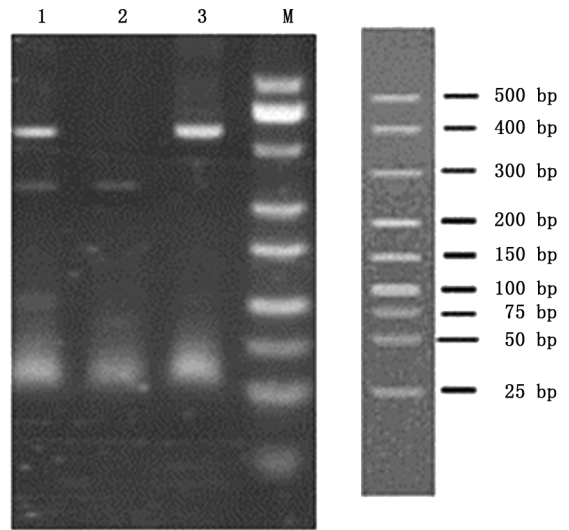


注：M 为 Marker；1 为 AA 基因型；2 为 aa 基因型；3 为 Aa 基因型；VDR 为维生素 D 受体

图 1 VDR 基因 Apa I 位点电泳结果图

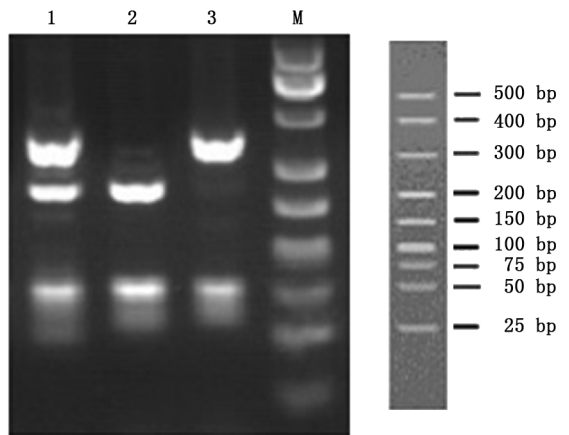
2.3 2 组间 VDR 的 Apa I、Bsm I 及 Taq I 基因多态性分布 吸烟 COPD 组与吸烟对照组之间 Apa I

基因型频率比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 6.000, P < 0.05$)；而 2 组之间 Bsm I 及 Taq I 基因型频率比较差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.250、1.507, P$ 值均 > 0.05)。见表 2。



注：M 为 Marker；1 为 Bb 基因型；2 为 bb 基因型；3 为 BB 基因型；VDR 为维生素 D 受体

图 2 VDR 基因 Bsm I 位点电泳结果图



注：M 为 Marker；1 为 Tt 基因型；2 为 tt 基因型；3 为 TT 基因型；VDR 为维生素 D 受体

图 3 VDR 基因 Taq I 位点电泳结果图

2.4 2 组研究对象 VDR 基因 3 个位点基因型及等位基因的频率分布 吸烟 COPD 组与吸烟对照组 Apa I 位点的 aa、Aa、AA 基因型频率分布差异有统计学意义 ($\chi^2 = 6.000, P < 0.05$)。以 Aa+AA 基因型做参照，携带 aa 基因型可能会增加吸烟人群 COPD 的发病风险 (OR = 2.786, 95% CI : 1.215~6.389)。2 组的 a、A 等位基因频率分布差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.432, P < 0.05$)，且与携带等位基因 A 相比，携带等位基因 a 的个体可能会增加吸烟人群 COPD 的发病风险 (OR =

表 2 2 组研究对象 VDR 的 ApaI、BsmI 及 TaqI 基因多态性分布 (例)

组别	例数	Apa I			Bsm I			Taq I		
		AA	Aa	aa	BB	Bb	bb	TT	Tt	tt
吸烟对照组	50	4	32	14	0	9	41	37	13	0
吸烟 COPD 组	50	2	22	26	0	11	39	42	8	0
χ^2 值		6.000			0.250			1.507		
P 值		0.014			0.617			0.220		

注: VDR 为维生素 D 受体

1.897, 95% CI: 1.042~3.457)。2 组 Bsm I 位点的 bb、Bb 基因型频率分布差异无统计学意义 ($\chi^2=0.250, P>0.05$); 2 组的 b、B 等位基因频率分布差异无统计学意义 ($\chi^2=0.222, P>0.05$)。2 组 Taq I 位点的 Tt、TT 基因型频率分布差异无统计学意义 ($\chi^2=1.507, P>0.05$); 2 组的 t、T 等位基因频率分布差异无统计学意义 ($\chi^2=1.330, P>0.05$)。见表 3。

3 讨论

很多 COPD 患者确实存在血清 25-羟维生素 D 水平降低^[5]。越来越多的证据表明, 低水平的维生素 D 与 FEV₁ 下降、免疫功能紊乱、气道炎症增加密切相关^[1]。维生素 D 在体内经过两步羟化后转变为具有活性的 1, 25-二羟维生素 D, 通过与靶细胞内特异性受体-VDR 结合形成激素-受体复合物, 从而发挥各种生理作用。因此 VDR 是维生素 D 代谢途径中的重要位点。VDR 除存在于肠道、肾脏和骨骼以外, 还存在于许多其他组织, 1, 25-二羟维生素 D 作用于这些组织细胞内的 VDR 后, 发挥许多非经典作用。目前已有研究发现, VDR 基因多态性与 COPD 存在关联。Kim 等^[6]研究表明, VDR 基因多态性与 COPD 患者骨质疏松的发

生存在显著相关性。Hopkinson 等^[7]发现, VDR 基因多态性影响 COPD 患者的股四头肌肌力从而增加 COPD 患者跌倒的风险。有研究发现, VDR-Apa I 基因可能是 COPD 的易感基因^[8]。

吸烟是 COPD 最重要的环境危险因素。本研究显示, COPD 组吸烟严重度指数与对照组的差异有统计学意义, 提示吸烟严重度可能与 COPD 发病相关。目前免疫方面的研究是 COPD 发病机制研究中的热点。近来有学者提出 COPD 肺气肿患者肺内存在免疫调节异常, T 细胞介导的获得性免疫启动并参与了 COPD 肺气肿的发病过程^[9]。吸烟的 COPD 患者肺内存在寡克隆 CD4⁺T 细胞聚集^[10], COPD 可能是一种由烟草烟雾诱发、CD4⁺T 细胞参与的炎症反应及自身免疫病^[11]。维生素 D 可通过增强吞噬作用、氧化应激、趋化性和抗菌肽的生成, 从而阻止呼吸道上皮细胞、单核细胞、巨噬细胞和树突细胞的过度产生炎症细胞因子^[12]。通过小鼠模型发现, 暴露在烟草环境中维生素 D 缺乏的小鼠肺组织有大量巨噬细胞浸润, 气道内有 CD4、CD8T 细胞浸润, 同时炎症介质也明显增多, 在补充维生素 D 后这种情况就被抑制了^[13]。烟草暴露可能引起 COPD 炎症反应加剧以及免疫受损, 而维生素 D 可能参与免疫调节, 具有改善

表 3 2 组研究对象 VDR 基因 3 个位点基因型及等位基因的频率分布 [个 (%)]

组别	Apa I				
	aa	Aa	AA	a	A
吸烟 COPD 组	26(52.0)	22(44.0)	2(4.0)	74(74.0)	26(26.0)
吸烟对照组	14(28.0)	32(64.0)	4(8.0)	60(60.0)	40(40.0)
χ^2 值	6.000		4.432		
P 值	0.014		0.035		
OR 值	2.786	1	1.897		1
95% CI	1.215~6.389		1.042~3.457		

组别	Bsm I				Taq I			
	bb	Bb	b	B	Tt	TT	t	T
吸烟 COPD 组	39(78.0)	11(22.0)	89(89.0)	11(11.0)	8(16.0)	42(84.0)	8(8.0)	92(92.0)
吸烟对照组	41(82.0)	9(18.0)	91(91.0)	9(9.0)	13(26.0)	37(74.0)	13(13.0)	87(87.0)
χ^2 值	0.250		0.222		1.507		1.330	
P 值	0.617		0.637		0.220		0.249	
OR 值	0.778	1	0.800	1	0.542	1	0.582	1
95% CI	0.291~2.082		0.316~2.024		0.202~1.452		0.230~1.472	

注: VDR 为维生素 D 受体

COPD 患者免疫功能及炎症反应的作用。

本研究针对长沙地区汉族吸烟人群,选取与 COPD 可能相关的 VDR 基因多态酶切位点 Apa I、Bsm I 以及 Taq I,探求 VDR 基因多态性与吸烟人群 COPD 易感性的关系。结果显示吸烟 COPD 患者与吸烟对照组之间 Apa I 位点的 aa、Aa、AA 基因型频率分布差异有统计学意义;以 Aa+AA 基因型做参照,携带 aa 基因型可能会增加吸烟人群 COPD 的发病风险。2 组的 a、A 等位基因频率分布差异有统计学意义;且与携带等位基因 A 相比,携带等位基因 a 的个体可能会增加吸烟人群 COPD 的发病风险。而 2 组中 Bsm I 和 Taq I 基因型和等位基因频率差异无统计学意义。这表明在 VDR 基因多态位点中, Apa I 的基因多态性可能增加吸烟人群 COPD 的易感性,而 Bsm I 以及 Taq I 位点多态性可能与吸烟人群 COPD 的易感性无关联。

研究 VDR 基因多态性与 COPD 易感性的关系对于探索 COPD 的发生机制、筛选其易感人群、增强 COPD 的防控等均有重要意义。通过本研究,表明 VDR 基因 Apa I 位点与长沙地区汉族吸烟人群 COPD 的易感性可能有关,而与 Bsm I 和 Taq I 位点可能无关。有研究证实, VDR 基因多态性位点突变会直接影响受体与 1, 25-二羟维生素 D 的结合能力,从而会造成受体严重的功能缺失^[14]。COPD 是一种慢性气道炎症性疾病。Ishii 等^[15]研究发现, VDR 表达是影响小鼠肺组织抗炎反应的重要因素。这可能是 VDR 参与 COPD 发生、发展过程的一种机制。但 VDR 基因多态性具体通过何种机制参与 COPD 的发生、发展过程,以及吸烟是否会引起 VDR 基因突变从而导致 VDR 功能缺失,还有待于在今后的研究工作中进一步证实。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] 潘辉,范临夏,王小军,等.血清 25 羟维生素 D3 或 1,25 二羟维生素 D3 水平与慢性阻塞性肺疾病关系的 Meta 分析[J].国际呼吸杂志,2016,36(12):885-892. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2016.12.002.
- [2] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组.慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013 年修订版)[J].中华结核和呼吸杂志,2013,36(4):255-264. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2013.04.007.
- [3] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.中国临床戒烟

指南(2015 年版)[J].中华健康管理学杂志,2016,10(2):88-95. DOI:10.3760/cma.j.issn.1674-0815.2016.02.003.

- [4] Global initiative for chronic obstructive lung disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease 2018 report[EB/OL]. [2017-12-05].http://www.goldcopd.org.
- [5] 姚婉贞,路明.2015 年新版 GOLD 指南要点解读[J].浙江医学,2015,37(4):269-270,282.
- [6] Kim SW, Lee JM, Ha JH, et al. Association between vitamin D receptor polymorphisms and osteoporosis in patients with COPD[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2015, 10:1809-1817. DOI:10.2147/COPD.S91576.
- [7] Hopkinson NS, Li KW, Kehoe A, et al. Vitamin D receptor genotypes influence quadriceps strength in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Am J Clin Nutr, 2008, 87(2):385-390. DOI:10.1093/ajcn/87.2.385.
- [8] 张平,朱应群,李喆,等.长沙地区慢性阻塞性肺疾病患者维生素 D 受体基因多态性分布[J].中国医师杂志,2017,19(11):1615-1617. DOI:10.3760/cma.j.issn.1008-1372.2017.11.004.
- [9] 黄秋嫔,钟小宁. T 淋巴细胞介导的免疫在 COPD 肺气肿发病机制中的作用[J].中华微生物学和免疫学杂志,2010,30(2):190-194.
- [10] Sullivan AK, Simonian PL, Falta MT, et al. Activated oligoclonal CD4⁺ T cells in the lungs of patients with severe emphysema[J]. Proc Am Thorac Soc, 2006, 3(6):486. DOI:10.1513/pats.200603-062MS.
- [11] Wang H, Peng W, Weng Y, et al. Imbalance of Th17/Treg cells in mice with chronic cigarette smoke exposure[J]. Int Immunopharmacol, 2012, 14(4):504-512. DOI:10.1016/j.intimp.2012.09.011.
- [12] 李俊,余荣环,茅俊杰,等.慢性阻塞性肺疾病患者血清 25-(OH)D3 水平与肺功能及免疫功能的相关性研究[J].临床肺科杂志,2018,23(2):266-269. DOI:10.3969/j.issn.1009-6663.2018.02.020.
- [13] Heulens N, Korf H, Cielen N, et al. Vitamin D deficiency exacerbates COPD-like characteristics in the lungs of cigarette smoke-exposed mice[J]. Respir Res, 2015, 16:110. DOI:10.1186/s12931-015-0271-x.
- [14] Cai Q, Chandler JS, Wasserman RH, et al. Vitamin D and adaptation to dietary calcium and phosphate deficiencies increase intestinal plasma membrane calcium pump gene expression[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90(4):1345-1349.
- [15] Ishii M, Yamaguchi Y, Isumi K, et al. Transgenic Mice Overexpressing Vitamin D Receptor (VDR) Show Anti-Inflammatory Effects in Lung Tissues[J]. Inflammation, 2017, 40(6):2012-2019. DOI:10.1007/s10753-017-0641-2.

(收稿日期:2018-06-21)