

云南白族低枸橼酸尿症与 VDR 基因启动子甲基化水平的关系

林晓伟 罗钰辉 李静玲 张白羽 柯坤彬 李 颢

摘要 目的 研究维生素 D 受体(VDR)基因启动子甲基化水平与云南白族人群特发性低枸橼酸尿症之间的关联性。方法 选取 15 例 VDR 基因单核苷酸多态性位点(SNP shot) rs2228570(*Fok I*) 基因型为双显性表达(FF 型)的云南白族特发性低枸橼酸尿症患者为实验组,15 例尿枸橼酸含量正常的云南白族体检者为对照组。先取两组人员的血液标本,经过亚硫酸盐处理后,通过 PCR 扩增、T7 DNA 聚合酶的体外转录过程得到各 RNA 产物,经碱基特异性酶切处理后得到对应 RNA 小片段,最后通过 EpiTYPER 程序得出每个检测位点的甲基化程度。结果 与对照组 [1.261% (0.827%~1.930%)] 比较,实验组的 VDR I 片段甲基化水平 [4.136% (1.655%~5.152%)] 较高,差异有统计学意义 ($P < 0.001$);在 VDR I 片段上 33 个 CpG 位点中,实验组和对照组在 CpG-5 ($F = 8.831, P = 0.008$) 和 CpG-8 ($F = 16.155, P = 0.001$) 两个位点上的 DNA 甲基化水平差异有统计学意义。结论 VDR 基因启动子甲基化水平升高与云南白族特发性低枸橼酸尿症的发生存在关联性。VDR 基因 SNP 位点 *Fok I* 为 FF 型的白族患者 VDR 基因启动子 DNA 甲基化水平较正常白族人群显著升高。

关键词 维生素 D 受体; 基因启动子; DNA 甲基化; 特发性低枸橼酸尿症

中图分类号 R 691.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)04-0573-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.04.009

泌尿系结石是泌尿外科的常见病,已有研究^[1-2]表明尿中结石抑制因子枸橼酸的缺乏对钙性结石的形成有着重要影响,且低枸橼酸尿症与 VDR 基因的过低表达有关。

在课题组前期研究^[3]中,通过对云南特发性低枸橼酸尿症患者的遗传学研究,发现 VDR 基因 SNP 位点 rs2228570(*Fok I*) 与云南白族人群特发性低枸橼酸尿症呈正相关,尤其是 FF 型基因有统计学

差异 ($P < 0.01$)。有研究^[4]表明,SNP 位点可以通过调节 SNP 位点周围的 DNA 甲基化水平来控制基因的表达。该实验通过对云南白族特发性低枸橼酸尿症患者 VDR 基因启动子附近 DNA 片段的甲基化水平进行检测,来研究其与特发性低枸橼酸尿症之间的关联性,从而为我国云南地区少数民族泌尿系结石病因研究和防治工作寻找新的研究方向。

1 材料与方法

1.1 试剂与耗材 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司);EZ DNA Methylation-Gold kit(美国 Zymo Reserch 公司);RT-PCR 反应试剂盒(日本 Takara 公司);SAP 反应试剂盒、T 切反应/RNase A 消化反应试剂盒(美国 Fermentas 公司)。

1.2 病例资料 选择 2013 年 10 月—2020 年 2 月在昆明医科大学附属第一医院泌尿外科住院的云南白族泌尿系结石患者,在尿枸橼酸含量检测低于正常值且在 VDR 基因 SNP 位点 *Fok I* 基因型检测为 FF 基因型的 38 例患者中,随机抽取 15 例作为实验组,同时在该院体检的尿枸橼酸含量检测正常的 120 例白族人群中随机抽取 15 例作为对照组。各组均禁食 12 h 过夜后,于清晨抽取静脉血样本 3 ml,存于 -80°C 冰箱保存;留 24 h 尿液并记录尿量,进行生化指标检测和甲基化分析。

该研究符合赫尔辛基宣言的标准,所有研究对象均为自愿参加本次研究,并签署知情同意书,本研究承诺对研究对象的个人信息严格保密。

1.3 选择标准 入选标准:①泌尿系结石的诊断依据术前泌尿系 CT 平扫、腹部平片(KUB)或碎石手术记录;②低枸橼酸尿症的诊断依据是患者 24 h 尿枸橼酸排泄量小于 320 mg;③通过 Sanger 测序法检测 VDR 基因 SNP 位点 *Fok I* 的基因型为 FF 型。排除标准:患肾功能衰竭、泌尿系感染、肾小管酸中毒、低镁血症、慢性胃肠疾病、痛风、肿瘤、近期服用噻嗪类利尿剂、糖皮质激素或雌激素及甲状旁腺功能亢进等代谢性疾病患者。

1.4 研究方法

2023-02-13 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81460141);云南省高层次卫生技术人才项目(编号:D-2017043);云南省科技厅应用基础研究重点项目(编号:202001AY070001-458)

作者单位:昆明医科大学附属第一医院泌尿外科,昆明 650032

作者简介:林晓伟 男 硕士研究生;

李 颢 男 教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: lihao2021@126.com

1.4.1 样本的 DNA 提取和亚硫酸盐处理 使用“血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒”对血液标本进行 DNA 提取,再使用“EZ DNA Methylation-Gold kit”进行亚硫酸盐处理。亚硫酸氢盐处理标本 DNA 时,未发生甲基化的胞嘧啶会被转化为尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶不变,可以通过此特性将基因中发生甲基化的部分标记出来。

1.4.2 引物的设计及合成 通过查阅相关文献,确定 VDR 基因启动子的基因序列,并选择位于 VDR 基因的近端启动子中的 CpG 岛进行甲基化分析,最终选取 VDR 基因启动子 3 个片段进行检测。通过 EpiDesigner 软件确定引物方案后,委托武汉艾健康技术有限公司进行合成,具体引物序列见下表 1。

表 1 VDR 基因启动子 3 个片段的引物序列

VDR 基因片段	引物序列(5'-3')
VDR I	正向: TTTAGGTTTTAGGAGGTAGTTTT
	反向: AAACCTAACCAACCAAAACTTC
VDR II	正向: GTTYGTAGTAGGTTGGGTAGAATTA
	反向: TCAACCACCTATAAACCCAC
VDR III	正向: TGTGGGTTGTTTTGTTTGT
	反向: TTATTACCCAAATACTAAACACTATATTAAC

1.4.3 Sequenom MassArray 系统甲基化检测 完成 PCR 扩增反应,得到带有 T7 RNA 聚合酶启动子序列的 DNA 片段扩增产物,通过 SAP 反应完成扩增产物的 DNA 去磷酸化,使其成为可测序的模板,然后通过 T7 RNA 聚合酶催化酶切反应完成目的基因的转录,可以得到待测基因序列的 RNA 转录单链,再通过 RNase A 消化反应将转录得到的 RNA 单链降解成分析检测所需的 RNA 小片段,最后经树脂纯化的 RNA 小片段便可上机检测,完成其 DNA 甲基化水平检测。测试的 CpG 位点以它们与转录起始位点之间的相对位置顺序命名,甲基化胞嘧啶与总测试胞嘧啶的百分比计算为每个 CpG 位点的甲基化水平,每个 CpG 位点的甲基化水平总和为该片段的甲基化水平。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,计量结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对于甲基化水平以中位数(最小值-最大值)表示。计数资料采用 χ^2 检验,计量资料采用 *t* 检验,两组之间的甲基化水平差异采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料与生化指标 实验组 24 h 尿枸橼酸

(239.58 ± 80.41) mg 与对照组 (595.71 ± 130.63) mg 比较差异有统计学意义 ($t = -37.089, P < 0.001$),但在年龄、性别(使用 χ^2 检验分析)、体质指数、尿量、尿钙含量、血甲状旁腺激素、血钙等方面差异无统计学意义。见表 2。

表 2 实验组与对照组一般资料与生化指标分析($n = 15, \bar{x} \pm s$)

一般资料与生化指标	实验组	对照组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
年龄(岁)	49.47 ± 10.97	43.40 ± 9.91	1.598	0.123
性别(<i>n</i> 男/女)	8/7	9/6	0.136	0.713
体质指数(kg/m ²)	26.5 ± 5.8	27.1 ± 5.3	-1.315	0.140
尿量(L/d)	1.8 ± 0.8	1.9 ± 1.0	1.395	0.150
尿枸橼酸(mg/d)	239.58 ± 78.35	586.61 ± 88.63	-57.089	<0.001
尿钙(mg/d)	188 ± 110	195 ± 117	-0.533	0.610
血甲状旁腺激素(pg/ml)	45 ± 27	46 ± 26	0.427	0.770
血钙(mmol/L)	2.30 ± 0.35	2.27 ± 0.37	0.602	0.510

2.2 VDR 基因启动子 NDA 甲基化水平总体分析

本实验共选取检测了 VDR 基因启动子 3 个片段的甲基化水平,其中在 VDR I 片段上,实验组的甲基化水平为 4.136% (1.655%~5.152%),高于对照组 1.261% (0.827%~1.930%),差异有统计学意义 ($F = 28.601, P < 0.001$),而在 VDR II 片段 ($F = 0.485, P = 0.495$)、VDR III 片段 ($F = 0.179, P = 0.677$) 上,二组之间的甲基化水平差异无统计学意义。见表 3。

表 3 VDR 基因启动子 NDA 甲基化水平总体分析表[中位数(最小值~最大值)]

VDR 片段	甲基化水平		<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
	实验组	对照组		
VDR I	4.136% (1.655%~5.152%)	1.261% (0.827%~1.930%)	28.601	<0.001
VDR II	0 (0~2.273%)	0 (0~2.227%)	0.485	0.495
VDR III	0.690% (0~1.724%)	1.034% (0~2.011%)	0.179	0.677

2.3 VDR I 片段 CpG 岛甲基化位点分析

在有统计学差异的 VDR I 片段上共检测了 33 个 CpG 位点,在这些 CpG 位点中,实验组和对照组在 CpG-5 ($F = 8.831, P = 0.008$) 和 CpG-8 ($F = 16.155, P = 0.001$) 两个位点上 DNA 甲基化水平差异有统计学意义,而在 CpG-28、CpG-30、CpG-32 三个位点上均未发现甲基化。见表 4。

3 讨论

泌尿系结石的发病机制被认为是由遗传基因、

表4 VDR I 片段 CpG 岛甲基化位点分析

CpG 岛位点	甲基化水平[中位数(最小值~最大值)]		F 值	P 值
	实验组	对照组		
CpG-1	0(0~0.200)	0(0~0.182)	0.016	0.901
CpG-2	0.091(0~0.200)	0(0~0.083)	3.940	0.063
CpG-3	0.083(0~0.100)	0(0~0.091)	0.304	0.588
CpG-4	0(0~0.200)	0.083(0~0.091)	0.006	0.939
CpG-5	0.100(0~0.250)	0(0~0.091)	8.831	0.008
CpG-6	0(0~0.167)	0(0~0)	1.038	0.322
CpG-7	0.091(0~0.200)	0(0~0.091)	2.991	0.101
CpG-8	0.091(0~0.200)	0(0~0)	16.155	0.001
CpG-9	0.091(0~0.200)	0(0~0.182)	3.144	0.093
CpG-10	0(0~0.200)	0(0~0)	3.197	0.091
CpG-11	0.091(0~0.182)	0(0~0.091)	0.721	0.407
CpG-12	0.091(0~0.200)	0(0~0.091)	3.732	0.069
CpG-13	0(0~0.100)	0(0~0)	2.243	0.152
CpG-14	0(0~0.100)	0(0~0)	1.627	0.218
CpG-15	0(0~0.275)	0(0~0.167)	0.151	0.702
CpG-16	0(0~0.273)	0(0~0)	2.001	0.174
CpG-17	0(0~0.100)	0(0~0)	2.245	0.151
CpG-18	0(0~0.091)	0(0~0.083)	0.007	0.935
CpG-19	0(0~0.182)	0(0~0.083)	0.076	0.786
CpG-20	0(0~0.091)	0(0~0)	0.321	0.578
CpG-21	0(0~0.364)	0(0~0.083)	0.218	0.646
CpG-22	0(0~0.100)	0(0~0)	1.122	0.303
CpG-23	0(0~0.091)	0(0~0)	0.321	0.578
CpG-24	0(0~0.200)	0(0~0.182)	0.016	0.901
CpG-25	0(0~0.182)	0(0~0)	0.614	0.444
CpG-26	0(0~0.182)	0(0~0)	1.989	0.175
CpG-27	0(0~0.182)	0(0~0)	2.630	0.122
CpG-28	0(0~0)	0(0~0)	-	-
CpG-29	0(0~0.091)	0(0~0)	0.321	0.578
CpG-30	0(0~0)	0(0~0)	-	-
CpG-31	0(0~0.100)	0(0~0.091)	0.090	0.768
CpG-32	0(0~0)	0(0~0)	-	-
CpG-33	0(0~0.091)	0(0~0)	0.321	0.578

自然地理环境、饮食生活习惯等内外多因素共同作用的结果。许多对尿石症发病机制和遗传学特质的研究都证实 VDR 基因参与了体内钙盐代谢和枸橼酸代谢,是泌尿系结石形成的关键基因^[5]。

云南省是我国泌尿系结石高发地区,各级医院泌尿外科的结石患者可达 50%,其中大理、楚雄、普洱及西双版纳等少数民族聚集地区尤为明显,甚至存在多个“结石村”,村内以白族、彝族、哈尼族等少数民族为主,近 60% 的村民患有或曾经患有泌尿系统不同部位的结石并有家族史。在课题组的前期调研中发现这些结石高发地区也具有较高低枸橼酸尿症发病率及遗传倾向,也证明 VDR 基因 SNP 位点与白族人群特发性低枸橼酸尿症的发生存在遗传学上的相关性^[3]。本研究选择基因型表达频率差异最显著的 FF 基因型患者 15 例为实验组进行研究,

实验表明 VDR 基因启动子甲基化水平升高与特发性低枸橼酸尿症的发生存在关联性。

目前关于 VDR 基因启动子 DNA 甲基化与疾病相关性的研究主要集中在肿瘤和代谢性疾病,如结肠癌、乳腺癌、肾上腺皮质癌、肺结核、糖尿病等,在这些相关研究中^[6-9],其 VDR 基因启动子 DNA 甲基化水平都高于正常水平,VDR 基因处于过低表达状态,使得包括维生素 D 在内的多种生物分子无法正常运转,导致疾病的发生和发展。贾招辉^[10]的研究表明沉默体内 VDR 基因的表达,可以降低肾上皮细胞内 VDR 基因的 mRNA 和蛋白含量;李康健等^[11-12]研究表明沉默细胞内的 VDR 基因,明显降低尿液中的枸橼酸含量。也有研究证实 VDR 的配体骨化三醇直接影响参与枸橼酸胞内跨膜转运的相关酶类活性^[13],VDR 本身也直接参与枸橼酸盐的快速排泄途径^[14]。此外,VDR 参与了调节编码磷酸烯醇丙酮酸羧化酶的基因转录,而该酶参与调节细胞内枸橼酸盐及尿枸橼酸盐水平^[15]。以上文献结合本实验结果进行推断,当患者的 VDR 基因启动子甲基化水平升高时,其体内肾上皮细胞中的 VDR 基因将发生基因沉默,从而引起肾小球上皮细胞对枸橼酸的排泄减少,肾小管上皮细胞对枸橼酸的分泌减少和重吸收增加,且与枸橼酸代谢相关的酶类活性也会随之变化,使得尿中的枸橼酸含量低于正常水平,从而导致特发性低枸橼酸尿症和泌尿系结石的发生。

本课题组旨在通过对特发性低枸橼酸尿症这一代谢性疾病的研究来探讨遗传因素和环境因素对泌尿系结石形成过程中的协同作用。但本实验目前由于样本量较少,且缺少对患者生活习惯及居住环境的流行病学调查,仅能初步证实 VDR 基因启动子 DNA 甲基化水平与云南白族人群特发性低枸橼酸尿症的关联性,下一步实验应扩大样本数量,并考虑环境因素对 DNA 甲基化的影响,探讨遗传和环境对疾病发生的协同作用。还可以将云南其他少数民族如彝族、傣族和哈尼族等纳入样本,再进行多民族间的比较研究。

综上所述,研究表明 VDR 基因启动子 DNA 甲基化水平升高与云南白族特发性低枸橼酸尿症的发生存在相关性。该研究为云南少数民族结石高发地区的结石早期预防和诊断提供了新的基因筛查位点,也为结石病因研究提供新的表观遗传学研究思路 and 方向。

参考文献

- [1] Skolarikos A, Straub M, Knoll T, et al. Metabolic evaluation and recurrence prevention for urinary stone patients: EAU guidelines [J]. *Eur Urol* 2015 67(4): 750–63.
- [2] Rendina D, De Filippo G, Gianfrancesco F, et al. Evidence for epistatic interaction between *VDR* and *SLC13A2* genes in the pathogenesis of hypocitraturia in recurrent calcium oxalate stone formers [J]. *J Nephrol* 2017 30(3): 411–8.
- [3] Li K J, Luo Y H, Mo Y, et al. Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and idiopathic hypocitraturia in a Chinese Bai population [J]. *Urolithiasis*, 2019 47(3): 235–42.
- [4] 董小婉, 陈婷婷, 吴翌, 等. 碘对大鼠钠碘转运体基因启动子区甲基化的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2020 55(7): 1052–6.
- [5] Uitterlinden A G, Fang Y, Van Meurs J B, et al. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms [J]. *Gene* 2004 338(2): 143–156.
- [6] Sun M, Guo B. Vitamin D and the epigenetic machinery in colon cancer [J]. *Curr Med Chem* 2017 24(9): 888–97.
- [7] Song D, Deng Y, Liu K, et al. Vitamin D intake, blood vitamin D levels, and the risk of breast cancer: a dose-response meta-analysis of observational studies [J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(24): 12708–32.
- [8] Pilon C, Urbanet R, Williams T A, et al. $1\alpha, 25$ -Dihydroxyvitamin D₃ inhibits the human H295R cell proliferation by cell cycle arrest: a model for a protective role of vitamin D receptor against adrenocortical cancer [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014 140: 26–33.
- [9] Jiang C, Zhu J, Liu Y, et al. The methylation state of *VDR* gene in pulmonary tuberculosis patients [J]. *J Thorac Dis* 2017 9(11): 4353–7.
- [10] 贾招辉. 骨形成相关因子和 $1, 25(\text{OH})_2\text{D}_3/\text{VDR}$ 在肾结石形成机制中的研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2014: 40–67.
- [11] 李康健, 莫茵, 申吉泓, 等. *VDR* 和 *NaDC1* 在 HK-2 细胞中的表达及其对低枸橼酸尿症的意义 [J]. *昆明医科大学学报*, 2016 37(1): 35–9.
- [12] 郭东群, 李颢, 李康健, 等. RNA 干扰维生素 D 受体基因表达对 HK-2 细胞中钠/二羧酸协同转运蛋白 1 表达的影响 [J]. *实用医学杂志* 2020 36(4): 451–5.
- [13] Mossetti G, Vuotto P, Rendina D, et al. Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and tubular citrate handling in calcium nephrolithiasis [J]. *J Intern Med* 2003 253(2): 194–200.
- [14] Lee S M, Meyer M B, Benkusky N A, et al. The impact of *VDR* expression and regulation *in vivo* [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2018 177: 36–45.
- [15] Zhu C, Ye Z, Chen Z, et al. Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and idiopathic hypocitraturia in the Chinese population [J]. *Urol Int* 2010 85(1): 100–5.

Relevance between hypocitraturia and *VDR* gene promoter methylation of the Bai nationality in Yunnan province

Lin Xiaowei, Luo Yuhui, Li Jingling, Zhang Baiyu, Ke Kunbin, Li Hao

(Dept of Urology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032)

Abstract Objective To investigate the relevance between vitamin D receptor (*VDR*) gene promoter methylation level and idiopathic hypocitraturia of the Bai nationality in Yunnan province. **Methods** Fifteen patients with idiopathic hypocitraturia of the Bai nationality in Yunnan province with double dominant expression (FF type) of single nucleotide polymorphism shot (SNP shot) rs2228570 (*Fok I*) genotype were selected as the experimental group. Fifteen people of the Bai nationality in Yunnan province with normal content of urinary citric acid were the control group. First, blood samples were taken from both groups. Next, the blood samples were treated with sulfites, RNA products of each sample were obtained by PCR amplification and *in vitro* transcription of T7 DNA polymerase. Then the corresponding RNA fragments were digested by base-specific enzymes. Finally the degree of methylation at each test site was obtained through the EpiTYPER procedure. **Results** In the statistical results of DNA methylation level, the methylation level of *VDR I* fragment experimental group was 4.136% (1.655%, 5.152%) which was higher than 1.261% (0.827%, 1.930%) in the control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.001$). Among the 33 CpG sites on *VDR I* fragment, there were significant differences in DNA methylation levels of CpG-5 ($F = 8.831$, $P = 0.008$) and CpG-8 ($F = 16.155$, $P = 0.001$) between the experimental group and the control group. **Conclusion** The increased methylation level of *VDR* gene promoter is related with idiopathic hypocitraturia of the Bai nationality of Yunnan province. And compared with the normal Bai nationality people, the DNA methylation level of *VDR* gene promoter significantly increased in the Bai nationality patients with FF type of *VDR* gene SNP shot *Fok I*.

Key words vitamin D receptor; gene promoter; DNA methylation; idiopathic hypocitraturia