

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.10.041

钙敏感受体(CaSR)基因 986、990 多态性与尿石症的相关性研究*

谢 坤 夏成兴 耿 波 赵恩阳 李学东[△]

(哈尔滨医科大学附属第二医院泌尿外科三病房 黑龙江 哈尔滨 150010)

摘要 目的:探讨钙敏感受体(CaSR)基因单核苷酸多态性与泌尿系结石的关系。**方法:**选取 90 例黑龙江地区的泌尿系结石患者及 90 例健康对照者外周血标本中的基因组 DNA,采用 PCR(聚合酶链反应)结合 DNA 测序,检测并分析 CaSR 基因的单核苷酸多态性位点的分布。**结果:**泌尿系结石组和对照组 CaSR 基因第 986 位、990 位频率分布符合 Hardy-Weinberg 定律,其基因型分布频率在泌尿系结石患者和健康对照者中差异无统计学意义($P>0.05$),但在泌尿系结石患者组内 CaSR 第 990 位 GG 纯合子和 RG 杂合子出现频率明显偏高,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**CaSR 基因第 7 外显子第 986、990 多态性位点与泌尿系结石的形成无直接相关性,但第 7 外显子第 990 位 A/G 单核苷酸多态性可能与泌尿系结石的形成密切相关。

关键词:钙敏感受体;泌尿系结石;单核苷酸多态性

中图分类号:R692 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2017)10-1953-04

Association between Calcium Sensitive Receptor (CaSR) Gene in 986,990 and Urinary Calculi*

XIE Kun, XIA Cheng-xing, GENG Bo, ZHAO En-yang, LI Xue-Dong[△]

(Wards Three, Department of Uropoiesis Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship between the calcium sensitive receptor (CaSR) gene mononuclear acid polymorphism and the urinary calculi. **Methods:** 90 cases of urinary calculi patients and 90 healthy volunteers in Hei Longjiang province were selected, the genomic DNA in peripheral blood specimens were detected by PCR (polymerase chain reaction) and DNA sequencing. Then the distribution of the single nucleotide polymorphism loci of CaSR genes were detected and analyzed. **Results:** The frequency distributions of 986 and 990 genes in CaSR between Urinary calculi group with the control group were conformed to the Hardy-Weinberg's law. No statistically significant difference was found in the genotype distribution frequency between the two groups ($P>0.05$). But in the urinary calculi group, CaSR 990th GG homozygote was more frequency than RG heterozygote ($P<0.05$). **Conclusions:** In the exon 7 of CaSR, the 986th and 990th gene polymorphic loci had no direct relationship with the formation of urinary calculi, but the 990th A/G single nucleotide polymorphisms in the exon 7 of CaSR might have close relationship with the formation of urinary calculi.

Key words: Calcium-sensitive receptor(CaSR); Urinary calculi; Single nucleotide polymorphism

Chinese Library Classification(CLC): R692 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2017)10-1953-04

前言

泌尿系结石被认为是一种代谢性疾病,其发病受饮食、环境、遗传等多方面因素的影响,具有较高的发病率及复发率。钙敏感受体(CaSR)是一种 G 蛋白偶联受体,共有 21 个单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphisms, SNPs)^[1]。CaSR 基因由 7 个外显子构成,前 6 个外显子编码细胞外域 CaSR 蛋白,第 7 个外显子编码跨膜和细胞内域^[2]。CaSR 广泛分布在人体的各个组织中,其中以肾脏和甲状旁腺为甚,有强大的调节体内钙排泄的功能^[3,4]。近年来有越来越多的研究表明 CaSR 可作用于肾小管,调节钙离子的重吸收^[5]。因此,CaSR 与泌尿系含钙结石的

形成可能具有十分紧密的关系,不同成分的基因多态性可能与钙性结石的形成密切相关。本研究旨在探索黑龙江地区泌尿系结石患者中钙敏感受体基因多态性与结石形成的关系,以期为泌尿系结石的防控与治疗找到新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

外周血基因组 DNA 提取试剂盒(DP334)购自天根生化科技(北京)有限公司;Platinum[®]TaqDNA 聚合酶及缓冲液购自杭州沃森生物技术有限公司;DNA Marker 100bp 购自中科瑞泰(北京)生物科技有限公司;4dNTPs 购自上海谱振生物科技有限

* 基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(H201407)

作者简介:谢坤(1986-),男,硕士研究生,主要研究方向:泌尿系结石的病因诊断,E-mail: 362543846@qq.com

[△] 通讯作者:李学东(1965-),男,硕士生导师,教授,主要研究方向:泌尿系疾病的诊断与治疗

E-mail: 13604803553@163.com,电话:13604803553

(收稿日期:2016-11-04 接受日期:2016-11-25)

公司;100 bp DNA Ladder, 购自北京全式金生物技术有限公司;DNA 胶回收试剂盒购自上海索莱宝生物科技有限公司;721 紫外分光光度仪购自上海精密科技有限公司。

1.2 样本筛选及临床数据采集

1.2.1 样本筛选标准 选取 2015 年 10 月份到 2016 年 6 月份期间哈医大二院泌外三科收治的 90 例泌尿系结石患者,年龄在 18~75(40.5± 10.5)岁;男性患者 51 例,女性患者 49 例,所有患者经 CTU 和泌尿系超声确定诊断。对照组 90 例健康志愿者均来自哈医大二院体检中心,男性 47 人,女性 43 人,且排除泌尿系结石的既往史和家族史。泌尿系结石组及健康对照组均为黑龙江本土人士,且在本地长期生活达 15 年以上。

1.2.2 血液样本采集 结石组和对照组均抽取外周静脉血 5 mL,检测其血生化指标、甲状旁腺激素(PTH)、24 h 尿量及尿钙含量。同时两组患者另取外周静脉血 5 mL,置于 5 mL EDTA 抗凝管中,于高速离心机(Sigma Chemical Co, USA),3000r/min,离心 10 min。取上清 1 mL 置于 1.5 mL EP 管中,统一放置于 -80℃ 冰箱保存。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取 由天根生化科技(北京)有限公司外周血 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,721 紫外分光光度仪测定 DNA 浓度。

1.3.2 PCR 引物设计合成 根据 Gene Bank 检索到的钙感受体基因 DNA 序列,在 CaSR 基因第 7 外显子 986、990 突变位点上下游范围内,使用 Genefisher 软件设计引物,引物由北京安必奇生物科技有限公司设计合成,并测序验证合成序列正确。上游 5' CAGAAGGTCATCTTTGGCAGCGCA3';下游 5' TCTTCCTCAGAGGAAAGGAGTCTGG3'。

1.3.3 PCR 扩增 扩增 CaSR 基因第 7 外显子包涵的 2 个多态位点的 DNA 片段,分别位于基因 DNA 序列的第 986、990 位点,扩增的 PCR 产物片段长度为 450 bp。PCR 反应总面积是

50 μL,包括 200 ng 的模板 DNA 4 μL,0.5 μmol/L 上、下游引物各 4 μL,200 μmol/L dNTP 4 μL、1.5 mmol/L MgCl₂ 4 μL、5U TaqDNA 聚合酶 0.5 μL 及其缓冲液 24.5 μL。预变性 94℃ 持续 5 min,94℃ 持续 45 s,50℃ 和 72℃ 分别持续 1 min,总共循环 40 次,72℃ 延伸 10 min。

1.3.4 CaSR 多态性分析 PCR 扩增产物 1.5% 琼脂糖电泳,扩增成功则在紫外线灯下为长 444 bp 的单一一条带。将所有标本经 DNA 胶回收试剂盒切胶纯化后,在 PCR 仪(上海启前)上直接测序。

1.4 统计学分析

用 Pearson 卡方检验,根据 Hardy-Weinberg 定律,了解各基因型在人群中遗传平衡符合程度,并比较两组间各基因型及等位基因的频率差异。计量资料以均数± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,单因素方差分析比较各基因型间临床指标的差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR 产物电泳结果

纯化后的 PCR 产物电泳结果如图(图 1),在紫外线灯下分别可见约 450 bp 左右的单一一条带,目的片段条带清晰,无非特异性扩增。

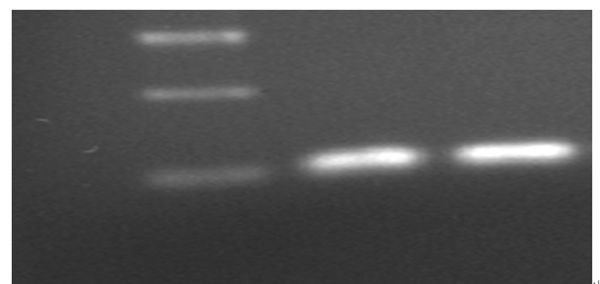


图 1 PCR 产物电泳显像

Fig.1 Electrophoretic imaging of PCR product

表 1 CaSR 基因 SNP 位点和相应的氨基酸的变化

Table 1 CaSR gene SNP loci and the corresponding amino acid

Genotype	SNPs		The change of the amino acid	
	986	990	986	990
GCCGGG	GCC	CGG	A	G
	GCC	GGG	A	G
GCCNGG	GCC	GGG	A	G
	GCC	AGG	A	R
NCCAGG	TCC	AGG	S	R
	CC	AGG	A	R
GCCAGG	GCC	AGG	A	R
	GCC	AGG	A	R
TCCAGG	TCC	AGG	S	R
	TCC	AGG	S	R
NCCNGG	TCC	GGG	S	G
	TCC	AGG	A	R
TCCNGG	GCC	AGG	A	G
	GCC	AGG	A	R

Note: A: alanine, G: glycine, R: arginine, S: serine

表 2 结石组和对照组的 CaSR 多态性位点基因和等位基因的频率分布

Table 2 CaSR gene polymorphism loci and allele frequency distribution in the stone group and the control group

Groups	A986S				R990G	
	AA	AS	SS	RR	RG	GG
stone group(n)	72	12	6	48	25	17
(%)	80%	13.3%	6.7%	53.3%	27.8%	18.9%
Control group(n)	78	10	2	55	24	11
(%)	86.7%	11.1%	2.2%	61.1%	26.7%	12.2%

Note: compared with the expected values, $P > 0.05$.

表 3 泌尿系结石组 CaSR 不同基因型血钙、PTH、尿钙值比较($\bar{x} \pm s$)Table 3 Comparison of the blood calcium and PTH, urinary calcium value between urinary calculi groups with different genotypes of CaSR ($\bar{x} \pm s$)

Groups	A986S				R990G	
	AA	AS	SS	RR	RG	GG
The number of cases(n)	72	12	6	48	25	17
Calcium ions in blood(mmol/L)	2.41 $\pm$ 0.21	2.39 $\pm$ 0.17	2.41 $\pm$ 0.18	2.47 $\pm$ 0.17	2.45 $\pm$ 0.09	2.39 $\pm$ 0.09
PTH(ng/L)	39.21 $\pm$ 13.51	43.01 $\pm$ 14.60	43.02 $\pm$ 11.97	47.89 $\pm$ 15.56	47.21 $\pm$ 16.03	37.90 $\pm$ 11.03*
Calcium in urine (mmol/24h)	6.95 $\pm$ 0.12	7.21 $\pm$ 0.31	7.31 $\pm$ 0.34	7.31 $\pm$ 0.21	7.51 $\pm$ 0.20	8.87 $\pm$ 0.19*

Note: urinary calculi group comparison: * ($P < 0.05$).

2.2 CaSR 基因测序结果

分别对两组 CaSR 位点进行检测,各等位基因频率分布均符合 Hardy-Weinberg 定律。经 $\chi^2 > 0.05$,提示 CaSR 基因位点单核苷酸多态性与泌尿系结石的发病无相关性。

990 位 GG 纯合子和 RG 杂合子的 24 小时尿钙含量较 RR 纯合子明显升高 ($P < 0.05$),GG 纯合子的血 PTH 值虽然在正常范围内,但较 RG 杂合子和 RR 纯合子降低($P < 0.05$),提示 990G 等位基因可能通过抑制 PTH 分泌参与泌尿系结石的形成。

3 讨论

泌尿系结石在我国的发病率约为 5%-10%,新发病率约为 150-200/10 万人,其中 25%的患者需住院治疗,在泌尿外科住院患者中居首位^[6]。泌尿系结石是一种多因素疾病,其中含钙结石占结石种类的 70%-80%,近年来有研究表明含钙结石的发生原因与 CaSR 密切相关^[7]。CaSR 是一种 G 蛋白偶联受体,在人体中的钙敏感受体是 178 个氨基酸组成的高保守结构多肽,在等离子体膜的二聚体态性^[1],在调节钙离子的平衡方面起着重要作用。CaSR 有 21 个单核苷酸多态性(SNPs),可使细胞外的钙离子能独立、快速的影响 PTH 的释放和肾小管细胞对钙的吸收,维持机体的钙平衡^[8]。

近年来,学者们进一步证明了 CaSR 是与尿钙重吸收有密切关系的蛋白之一。CaSR 的第 7 个外显子中 3 个 SNP(986S、990G、1011Q)可以导致含钙结石的形成^[9]。但我国学者杨奕等人认为 CasR 基因的第 7 外显子第 986、990 多态性位点等位基因频率分布均符合 Hardy-Weinberg 定律,其基因型分布频率在特发性高钙尿患者和正常对照者中差异无统计学意义 ($P >$

0.05),第 1011 位未见有多态改变^[10]。众所周知,特发性高钙尿与泌尿系结石的形成呈正相关^[11,12],所以有关 CaSR 在泌尿系结石、尤其是含钙结石的形成过程中是起抑制作用还是无相关性,目前尚无确切定论。

本研究经过对结石患者和健康志愿者的外周血清 PCR 结合 DNA 测序得出的结果显示 CaSR 第 7 外显子 (986 位点及 990 位点) 多态性在健康人和泌尿系结石患者的分布符合 Hardy-Weinberg 定律,这与国内外主流的观点是一致的^[13-15]。其中 CaSR 的第 986 位以 AA 纯合子最常见,第 990 位以 RR 纯合子最常见。在对 986 位点的研究中发现其在实验组和对照组中的不同基因型表达无差异,且对血钙、PTH、尿钙无明显影响。而在第 990 位点中,实验发现 GG 纯合子在泌尿系结石的人群中更常见,虽然其异未达到统计学意义,但泌尿系结石患者 24 小时的尿钙含量明显增加($P < 0.05$)^[16,17]。GG 纯合子的血 PTH 值虽然在正常范围内,但较 RG 杂合子和 RR 纯合子降低 ($P < 0.05$)。以上结论侧面提示其与泌尿系结石的形成的关系。CaSR 对尿钙的排泄起着复杂的调控作用,但本实验尚未能证明 CaSR 基因是泌尿系结石形成的易感基因。但结石患者 GG 纯合子的血 PTH 值较 RR 纯合子、RG 杂合子有所降低,提示第 990G 等位基因可能抑制了 PTH 的分泌,从而导致了肾小管对钙离子的重吸收起到了负反馈的抑制作用,进而对尿钙的排泄起抑制作用^[18-20]。

综上,CaSR 基因第 7 外显子 990 位 A/G 单核苷酸多态性可影响尿钙的排泄,但 CaSR 基因第 7 外显子第 986、990 多态性位点与泌尿系结石形成的关系还需要进一步研究证实。

参考文献(References)

- [1] Smajilovic S, Yano S, Jabbari R, et al. The calcium-sensing receptor and calcimimetics in blood pressure modulation [J]. *Br J Pharmacol*, 2011, 164(3): 884-893
- [2] G Vezzoli, A Terranegra, F Rainone, et al. Calcium-sensing receptor and calcium kidney stones [J]. *Journal of Translational Medicine*, 2011, 9(110): 1-9
- [3] PS Parfrey, TB Drü eke, GA Block, et al. The Effects of Cinacalcet in Older and Younger Patients on Hemodialysis: The Evaluation of Cinacalcet HCl Therapy to Lower Cardiovascular Events (EVOLVE) Trial [J]. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2015, 10(5): 791-799
- [4] CA Wagner. The calcium-sensing receptor directly regulates proximal tubular functions[J]. *Kidney International*, 2013, 84(2): 228-230
- [5] Goldfarb DS, Fischer ME, Keich Y, Goldberg J: A twin study of genetic and dietary influences on nephrolithiasis: a report from the Vietnam Era Twin (VET) Registry[J]. *Kidney Int*, 2005, 67:1053-1061
- [6] 陈志强, 姚林芳, 叶章群. 特发性草酸钙结石研究现状[J]. *临床泌尿外科杂志*, 2005, 05(5): 257-260
Chen zhi-qiang, Yao lin-fang, Ye zhang-qun. Idiopathic calcium oxalate stone of the research status of idiopathic calcium oxalate stone[J]. *Journal of clinical urology*, 2005, 05(5): 257-260
- [7] YH Chou, PY Woon, WC Chen, et al. A genetic polymorphism (rs17251221) in the calcium-sensing receptor gene (CASR) is associated with stone multiplicity in calcium nephrolithiasis [J]. *Plos One*, 2011, 6(9): 252-257
- [8] Hendy G N, Guarnieri V, Canaff L. Calcium-sensing receptor and associated diseases[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2009, 89: 31-95
- [9] N Shakhssalim, B Kazemi, A Basiri, et al. Association between calcium-sensing receptor gene polymorphisms and recurrent calcium kidney stone disease: A comprehensive gene analysis [J]. *Scandinavian Journal of Urology & Nephrology*, 2010, 44 (44): 406-412
- [10] 杨奕, 王少刚, 叶章群, 等. 钙感受受体基因第 7 外显子单核苷酸多态性与特发性高钙尿症的关系[J]. *中华实验外科杂志*, 2006, 23(5): 588-590
Yang Yi, Wang Shao-gang, Ye Zhang-qun, et al. Calcium sensitive receptor gene exon 7 of single nucleotide polymorphisms with idiopathic hypercalciuria [J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*, 2006, 23(5): 588-590
- [11] WChaabane, ACieğlar-Pobuda, MEI-Gazzah, et al. Human-Gyrovirus-Apoptin Triggers Mitochondrial Death Pathway-Nur77 is Required for Apoptosis Triggering[J]. *Neoplasia*, 2014, 16(9): 679-693
- [12] 王帅, 高尿钙症相关基因多态性的研究进展[J]. *国际泌尿系统杂志*, 2012, 32(1): 101-103
Wang Shuai. The research progress of high urinary calcium disease related gene polymorphism [J]. *International journal of urinary system*, 2012, 32(1): 101-103
- [13] R Lembrechts, I Brouns, K Schnorbusch, et al. Functional expression of the multimodal extracellular calcium-sensing receptor in pulmonary neuroendocrine cells [J]. *Journal of Cell Science*, 2013, 126(19): 4490-4501
- [14] N Shakhssalim, B Kazemi, A Basiri, et al. Association between calcium-sensing receptor gene polymorphisms and recurrent calcium kidney stone disease: A comprehensive gene analysis [J]. *Scandinavian Journal of Urology*, 2010, 44(6): 406-412
- [15] 疏东升, 陈维雄, 朱金水, 等. 钙感受受体在肠神经系统中的表达[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2014, 23(6): 636-639
Shu Dong-sheng, Chen Wei-wei, Zhu Jin-shui, et al. Calcium sensitive receptor expression in the enteric nervous system [J]. *Gastroenterology and liver disease*, 2014, 23(6): 636-639
- [16] CL Wu, QY Wu, JJ Du, Calcium-sensing receptor in the T lymphocyte enhanced the apoptosis and cytokine secretion in sepsis [J]. *Molecular Immunology*, 2015, 63(2): 337-342
- [17] 李笑然, 岳中瑾, 马俊海, 等. 钙感受受体活性改变对人鼠泌尿系草酸钙结石形成的影响[J]. *现代泌尿外科杂志*, 2013, 18(2): 116-120
Li Xiao-ran, Yue Zhong-jin, Ma Jun-hai, et al. Calcium sensitive receptor activity change on the influence of the rat urinary calcium oxalate stone formation [J]. *Journal of Modern Urology*, 2013, 18(2): 116-120
- [18] Guo J, Li HZ, Wang LC, et al. Increased expression of calcium-sensing receptors in atherosclerosis confers hypersensitivity to acute myocardial infarction in rats [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 366(1/2): 345-354
- [19] Mentaverri R, Yano S, Chattopadhyay N, et al. The calcium sensing receptor is directly involved in both osteoclast differentiation and apoptosis[J]. *FASEB J*, 2006, 20(14): 2562-2564
- [20] Seitz C, Fajkovic H. Epidemiology gender-specific aspects in urolithiasis[J]. *World J Urol*, 2013, 31(5): 1087-1092

(上接第 1920 页)

- [18] Raina SK, Awasthi B. Comparative study of single lateral locked plating versus double plating in type C bicondylar tibial plateau fractures[J]. *Indian J Orthop*, 2016, 50(3): 335
- [19] Wang Y, Luo C, Zhu Y, et al. Updated Three-Column Concept in surgical treatment for tibial plateau fractures-A prospective cohort study of 287 patients[J]. *Injury*, 2016, 47(7): 1488-1496
- [20] Kampa J, Dunlay R, Sikka R, et al. Arthroscopic-Assisted Fixation of Tibial Plateau Fractures: Patient-Reported Postoperative Activity Levels[J]. *Orthopedics*, 2016, 39(3): e486-491