

• 论著-临床研究 •

钙敏感受体基因多态性与江西赣南地区 含钙肾结石的相关性研究*

曾庆明¹ 邹晓峰¹ 曾晓鹏¹ 刘全亮¹ 谢天朋¹ 江波¹ 夏维¹
肖观称¹ 刘林伟¹ 赖长福¹ 祝家兴² 张国玺¹

[摘要] 目的:探讨钙敏感受体(calcium-sensing receptor, CaSR)基因多态性与江西赣南地区含钙肾结石(calcium nephrolithiasis, CN)的相关性。方法:采用实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time polymerase chain reaction, Real-time PCR) TaqMan-MGB 探针法检测赣南地区 220 例含钙肾结石患者(CN 组)和 250 例健康人群(对照组) CaSR 基因 rs9740、rs1501899、rs3749207、rs4678174、rs6776158、rs7652589、rs1042636、rs1801725、rs1801726、rs7632399 和 rs9883981 位点单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP),同时检测两组人群血钙和尿钙,应用 R 语言中 SNPassoc 1.9-2 和 Haplo. stats 2.17.0 软件分析 CaSR 基因型和单体型与含钙肾结石的相关性。结果:CN 组中 rs1501899 位点的 A 等位基因频率高于对照组($P < 0.001$);与对照组相比,CN 组中 rs1501899 位点 GG 基因型频率显著增高($P < 0.001$);CN 组+对照组 CaSR 基因 rs1501899 SNP 位点 GG 型组尿钙(9.509 ± 2.493) mg/dL 显著高于 AA 型组(8.719 ± 2.460) mg/dL ($P = 0.012$)及 AG 型组(8.813 ± 2.483) mg/dL ($P = 0.016$)。基因单体型分析显示,AATCAGAGCAA、AGCTGAGGCGG 单体型与 CN 的形成呈正相关($OR = 1.57, 95\%CI = 1.46 \sim 1.69$; $OR = 1.55, 95\%CI = 1.46 \sim 1.64$),AGCTAGGGCAA 与 CN 的形成呈负相关($OR = 0.87, 95\%CI = 0.79 \sim 0.96$)。结论:CaSR 基因多态性与江西赣南地区含钙肾结石的形成显著相关。

[关键词] 钙敏感受体;基因多态性;单体型;含钙肾结石

doi:10.13201/j.issn.1001-1420.2020.02.001

[中图分类号] R692 **[文献标志码]** A

The association between the gene polymorphisms in the calcium-sensing receptor and calcium nephrolithiasis in Jiangxi Gannan area

ZENG Qingming¹ ZOU Xiaofeng¹ ZENG Xiaopeng¹ LIU Quanliang¹
XIE Tianpeng¹ JIANG Bo¹ XIA Wei¹ XIAO Guanchen¹
LIU Linwei¹ LAI Changfu¹ ZHU Jiaxing² ZHANG Guoxi¹

(¹Department of Urology, First Affiliated Hospital of Gannan Medical University; Institute of Urology, Gannan Medical University, Ganzhou, Jiangxi, 341000, China; ²Department of Urology, People's Hospital of Ganxian District)

Corresponding author: ZHANG Guoxi, E-mail: gyfyurology@yeah.com

Abstract Objective: To explore the association between the CaSR gene polymorphisms and calcium nephrolithiasis in Gannan Area of Jiangxi Province. **Method:** In all, 220 cases of patients with calcium nephrolithiasis (CN group) and 250 cases of normal people (control group) in Gannan Area of Jiangxi Province were recruited in this study. Rs9740, rs1501899, rs3749207, rs4678174, rs6776158, rs7652589, rs1042636, rs1801725, rs1801726, rs7632399 and rs9883981 single nucleotide polymorphisms (SNP) in CaSR gene were all detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction TaqMan-MGB 5'-nuclease assay. And serum calcium and uric calcium in both groups were detected. The analysis of association between genotype or polymorphisms and calcium nephrolithiasis was performed with SNPassoc 1.9-2 and Haplo. stats 2.17.0 in R statistics program. **Result:** The frequency of the A allele of rs1501899 was higher than that in the control group ($P < 0.001$), and the frequency of the GG genotype of rs1501899 was higher than that in the control group ($P < 0.001$). Furthermore, the participants (CN group and control group) with GG genotype at rs1501899 had significantly higher urinary calcium con-

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(No:81260113,81160089);江西省科技厅科技计划项目(No:20132BBG70089);江西省卫生厅科技计划项目(No:20155440)

¹赣南医学院第一附属医院泌尿外科 江西省泌尿系统疾病临床医学研究中心 江西省结石防治工程技术研究中心(江西赣州,341000)

²江西省赣州市赣县区人民医院泌尿外科

通信作者:张国玺, E-mail: gyfyurology@yeah.com

centrations (9.509 ± 2.493 mg/dL) than that of participants carrying the AA genotype (8.719 ± 2.460) mg/dL ($P=0.012$) and that of participants carrying the AG genotype (8.813 ± 2.483) mg/dL ($P=0.016$). CaSR gene haplotype analysis showed that haplotype AATCAGAGCAA, AGCTGAGGCGG was positively correlated with the formation of calcium nephrolithiasis ($OR=1.57$, $95\%CI=1.46-1.69$; $OR=1.55$, $95\%CI=1.46-1.64$, respectively), but haplotype AGCTAGGGCAA was negatively correlated with the formation of calcium nephrolithiasis ($OR=0.87$, $95\%CI=0.79-0.96$). **Conclusion:** CaSR gene polymorphisms were significantly associated with the formation of calcium nephrolithiasis in Gannan Area of Jiangxi Province.

Key words calcium-sensing receptor; gene polymorphisms; haplotype; calcium nephrolithiasis

江西赣南地区是泌尿系结石的高发区,其中以含钙结石为主。钙敏感受体(calcium-sensing receptor, CaSR)是调节肾小管 Ca^{2+} 浓度的重要蛋白,研究表明, CaSR 基因多态性可能通过基因转录调控影响该基因的表达,并通过某种方式改变该受体的活性,影响尿中 Ca^{2+} 浓度的变化,从而影响含钙肾结石(calcium nephrolithiasis, CN)的形成。本研究通过检测江西赣南地区 CN 患者 CaSR 基因单核苷酸多态性(SNP)的变化,探讨 CaSR 基因多态性与该地区 CN 的相关性。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选择 2013 年 9 月~2015 年 7 月我院泌尿外科住院的江西赣南地区患者 220 例,根据尿石症诊断标准,均经 B 超、KUB、IVU 等检查确诊为肾结石,手术取石或是体外碎石后经结石成分分析确诊为含钙肾结石且排除高尿酸血症、痛风、甲状旁腺功能亢进(血清甲状旁腺素检测)、泌尿系肿瘤等疾病,患者间均无血缘关系。对照组选择 250 例同期我院江西赣南地区健康体检人群,年龄及性别比例与结石组相匹配。均无结石、肿瘤等家族史,均经 B 超、KUB、IVU 等检查排除泌尿系结石,正常对照组间均无血缘关系。入选对象均来自江西赣南地区汉族人群,为尊重每位入选对象的知情权,均予详细解释并征得其同意。本研究经赣南医学院第一附属医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 抽取研究纳入人群静脉血 5 mL,采用美国 Axygen 公司 AxyPrep 血基因组 DNA 试剂盒提取基因组 DNA,置于 $-80^{\circ}C$ 冰箱保存。

1.2.2 多态性位点选择 根据公共 SNP 数据库以及利用国际人类基因组单倍型图谱计划(International HapMap Project) HapMap 数据库和 Haploview 软件选择 CaSR 基因中频数 ≥ 0.05 ,并结合文献报道与肾结石相关的 SNPs,最后我们筛选出 11 个 SNPs 位点: rs9740、rs1501899、rs3749207、rs4678174、rs6776158、rs7652589、rs1042636、rs1801725、rs1801726、rs7632399、

rs9883981 进行研究。

1.2.3 基因多态性的检测 采用实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time polymerase chain reaction, Real-time PCR) TaqMan-MGB 探针法检测 CaSR 基因 SNP 位点 rs9740、rs1501899、rs3749207、rs4678174、rs6776158、rs7652589、rs1042636、rs1801725、rs1801726、rs7632399 和 rs9883981 多态性。引物和探针均由美国 Applied Biosystems 公司设计并合成,采用德国 QIAGEN 公司 Rotor-Gene Q 5-plex HRM 荧光定量 PCR 仪进行测定。每个反应体系皆为 20 μ L, DNA 含量约为 15 ng。PCR 扩增循环条件为: $95^{\circ}C$ 10 min, $92^{\circ}C$ 15 s, $60^{\circ}C$ 1 min, 共 40 个循环。

1.2.4 血、尿钙离子浓度测定 用 5mL 浓盐酸防腐剂无菌容器收集尿液,应用体液钙离子浓度比色定量检测法对尿钙浓度进行测定。应用 Quanti-ChromTM Calcium Assay Kit 检测尿液中钙离子浓度。抽取研究纳入人群静脉血 5mL,采用罗氏 Cobas8000 全自动生化分析仪(德国罗氏诊断有限公司)测定血清钙浓度。

1.2.5 统计学方法 采用 Haploview 4.0 软件进行连锁不平衡(LD)分析。采用 R statistics program 3.1.2 程序包进行统计学处理。CN 组和对照组间计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学分析采用 t 检验;计数资料采用 χ^2 检验。CaSR 基因型和单体型分析采用 SNPassoc 1.9-2 和 haplo.stats 2.17.0 软件。所有检验均为双侧概率检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象的一般资料及血液、尿液钙离子浓度比较

含钙肾结石组(CN 组)与健康对照组年龄、性别、BMI、血钙浓度比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),两组尿钙浓度比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。CaSR 基因 rs9740、rs1501899、rs3749207、rs4678174、rs6776158、rs7652589、rs1042636、rs1801725、rs1801726、rs7632399 和 rs9883981 位点基因型频率在 CN 组和对照组均符合 Hardy-weinberg 平衡定律。

表 1 CN 组与对照组一般临床资料比较

	CN 组(<i>n</i> = 220)	对照组(<i>n</i> = 250)	<i>t</i>	<i>P</i>
年龄/岁	46.55 ± 12.837	45.48 ± 16.827	0.767	0.444
性别/例			0.182	0.670
男	118	139		
女	102	111		
BMI/(kg · m ⁻²)	21.454 ± 2.619	21.088 ± 2.492	1.549	0.122
血钙浓度/(mmol · L ⁻¹)	2.348 ± 0.161	2.356 ± 0.118	0.560	0.576
尿钙浓度/(mg · dL ⁻¹)	10.589 ± 2.219	7.514 ± 1.715	16.915	<0.001

2.2 CaSR 基因型和 CN 的关系

CN 组中 CaSR 基因 rs1501899 位点的 G 等位基因频率显著高于对照组($P < 0.001$),见表 2。以 AA 基因型为参照,与对照组相比,CN 组中 CaSR 基因位点 rs1501899 GG 基因型和 AG + GG 基因型比例较高($P < 0.001$),见表 3。而 CaSR 基因其他位点等位基因及基因型两组间差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2、3。CN 组 + 对照组 CaSR 基因 rs1501899 SNP 位点 GG 型组尿钙(9.509 ± 2.493) mg/dL 显著高于 AA 型组(8.719 ± 2.460) mg/dL($P = 0.012$)及 AG 型组($8.813 \pm$

2.483) mg/dL($P = 0.016$),见表 4。

2.3 CaSR 单体型和 CN 的关系

CaSR 基因 rs9740、rs1501899、rs3749207、rs4678174、rs6776158、rs7652589、rs1042636、rs1801725、rs1801726、rs7632399 和 rs9883981 位点单体型分析显示,在频率大于 5% 的单体型中 AATCAGAGCAA、AGCTGAGGCGG 与含钙肾结石的形成呈正相关($OR = 1.57, 95\%CI = 1.46 \sim 1.69$; $OR = 1.55, 95\%CI = 1.46 \sim 1.64$),AGCTAGGGCAA 与含钙肾结石的形成呈负相关($OR = 0.87, 95\%CI = 0.79 \sim 0.96$),见表 5。

表 2 CN 组和对照组人群等位基因频率分布比较

多态性位点	等位基因	CN 组等位基因频数/%	对照组等位基因频数/%	<i>P</i>	<i>OR</i> (95% <i>CI</i>)
rs7652589	A	292(66.4)	305(61.0)	0.088	1.00(ref.)
	G	148(33.6)	195(39.0)		0.79(0.61~1.04)
rs6776158	A	153(34.8)	196(39.2)	0.161	1.00(ref.)
	G	287(65.2)	304(60.8)		1.21(0.93~1.58)
rs9883981	A	152(34.5)	194(38.8)	0.177	1.00(ref.)
	G	288(65.5)	306(61.2)		1.20(0.92~1.57)
rs1501899	A	193(43.9)	304(60.8)	<0.001	1.00(ref.)
	G	247(56.1)	196(39.2)		1.99(1.53~2.58)
rs7632399	A	214(48.6)	262(52.4)	0.249	1.00(ref.)
	G	226(51.4)	238(47.6)		1.16(0.90~1.50)
rs3749207	C	227(51.6)	282(56.4)	0.140	1.00(ref.)
	T	213(48.4)	218(43.6)		1.21(0.94~1.57)
rs4678174	C	185(42.0)	220(44.0)	0.546	1.00(ref.)
	T	255(58.0)	280(56.0)		1.08(0.84~1.40)
rs1801725	G	429(97.5)	487(97.4)	0.923	1.00(ref.)
	T	11(2.5)	13(2.6)		0.96(0.43~2.17)
rs1042636	A	199(45.2)	231(46.2)	0.765	1.00(ref.)
	G	241(54.8)	269(53.8)		1.04(0.80~1.35)
rs1801726	C	433(98.4)	497(99.4)	0.139	1.00(ref.)
	G	7(1.6)	3(0.6)		2.68(0.69~10.42)
rs9740	A	439(99.8)	500(100.0)	0.286	1.00(ref.)
	G	1(0.2)	0(0)		0.48(0.44~0.50)

表 3 CN 组和对照组 CaSR 基因的基因型频率分布

SNP 位点	基因型	基因型频率分布		原始 <i>P</i> 值 ^a	原始 <i>OR</i> (95% <i>CI</i>) ^a	校正后 <i>P</i> 值 ^b	校正后 <i>OR</i> (95% <i>CI</i>) ^b
		对照组 (<i>n</i> =250)	CN 组 (<i>n</i> =220)				
rs7652589	A/A	92(36.8)	98(44.5)		1.00(ref.)		1.00(ref.)
	A/G	121(48.4)	96(43.6)	0.213 3	0.74(0.50~1.10)	0.222 0	0.75(0.51~1.11)
	G/G	37(14.8)	26(11.8)		0.66(0.37~1.17)		0.66(0.37~1.17)
	A/G-G/G	158(63.2)	122(55.5)		0.72(0.50~1.05)		0.73(0.50~1.06)
rs6776158	G/G	92(36.8)	94(42.7)		1.00(ref.)		1.00(ref.)
	A/G	120(48.0)	99(45.0)	0.369 2	0.81(0.55~1.19)	0.390 0	0.82(0.55~1.21)
	A/A	38(15.2)	27(12.3)		0.70(0.39~1.23)		0.70(0.39~1.24)
	A/G-A/A	158(63.2)	126(57.3)		0.78(0.54~1.13)		0.79(0.54~1.14)
rs9883981	G/G	95(38.0)	96(43.6)		1.00(ref.)		1.00(ref.)
	A/G	116(46.4)	96(43.6)	0.408 0	0.82(0.55~1.21)	0.416 8	0.82(0.56~1.22)
	A/A	39(15.6)	28(12.7)		0.71(0.40~1.25)		0.71(0.40~1.25)
	A/G-A/A	155(62.0)	124(56.4)		0.79(0.55~1.15)		0.80(0.55~1.15)
rs1501899	A/A	92(36.8)	49(22.3)		1.00(ref.)		1.00(ref.)
	A/G	120(48.0)	95(43.2)	1.219×10^{-6}	1.49(0.96~2.31)	1.171×10^{-6}	1.51(0.97~2.34)
	G/G	38(15.2)	76(34.5)		3.76(2.23~6.32)		3.79(2.25~6.40)
	A/G-G/G	158(63.2)	171(77.7)		2.03(1.35~3.06)		2.06(1.37~3.11)
rs7632399	A/A	69(27.6)	55(25.0)		1.00(ref.)		1.00(ref.)
	A/G	124(49.6)	104(47.3)	0.458 4	1.05(0.68~1.63)	0.427 4	1.09(0.70~1.70)
	G/G	57(22.8)	61(27.7)		1.34(0.81~2.23)		1.38(0.83~2.30)
	A/G-G/G	181(72.4)	165(75.0)		1.14(0.76~1.73)		1.18(0.78~1.80)
rs3749207	C/C	81(32.4)	64(29.1)		1.00(ref.)		1.00(ref.)
	C/T	120(48.0)	99(45.0)	0.258 9	1.04(0.68~1.59)	0.251 8	1.02(0.67~1.57)
	T/T	49(19.6)	57(25.9)		1.47(0.89~2.44)		1.47(0.88~2.43)
	C/T-T/T	169(67.6)	156(70.9)		1.17(0.79~1.73)		1.15(0.78~1.71)
rs4678174	T/T	80(32.0)	67(30.5)		1.00(ref.)		1.00(ref.)
	C/T	120(48.0)	121(55.0)	0.199 6	1.20(0.80~1.82)	0.215 1	1.18(0.78~1.79)
	C/C	50(20.0)	32(14.5)		0.76(0.44~1.32)		0.75(0.43~1.31)
	C/T-C/C	170(68.0)	153(69.5)		1.07(0.73~1.59)		1.06(0.71~1.57)
rs1801725	G/G	237(94.8)	209(95.0)		1.00(ref.)		1.00(ref.)
	G/T	13(5.2)	11(5.0)	0.921 7	0.96(0.42~2.19)	0.920 2	0.96(0.42~2.19)
rs1042636	G/G	72(28.8)	61(27.7)		1.00(ref.)		1.00(ref.)
	A/G	125(50.0)	119(54.1)	0.617 1	1.12(0.74~1.72)	0.607 6	1.11(0.73~1.70)
	A/A	53(21.2)	40(18.2)		0.89(0.52~1.52)		0.87(0.51~1.50)
	A/G-A/A	178(71.2)	159(72.3)		1.05(0.70~1.58)		1.04(0.70~1.56)
rs1801726	C/C	247(98.8)	213(96.8)		1.00(ref.)		1.00(ref.)
	C/G	3(1.2)	7(3.2)	0.134 1	2.71(0.69~10.59)	0.135 8	2.70(0.69~10.62)
rs9740	A/A	250(100.0)	219(99.5)		1.00(ref.)		1.00(ref.)
	A/G	0(0.0)	1(0.5)	0.468 1	—	0.208 1	—

注：^aCN 组与对照组比较；^b按性别、年龄及体质量指数校正后。

表 4 CN 组 and 对照组 CaSR 基因 rs1501899 不同基因型临床指标间的比较

基因型	AA	AG	GG	P
CN 组与对照组				
例数	141	215	114	—
年龄/岁	47.23±15.489	44.74±15.434	46.76±13.807	0.257
BMI/(kg·m ⁻²)	21.259±2.672	21.243±2.515	21.292±2.508	0.987
血钙浓度/(mmol·L ⁻¹)	2.348±0.118	2.345±0.161	2.371±0.120	0.235
尿钙浓度/(mg·dL ⁻¹)	8.719±2.460	8.813±2.484	9.509±2.493 ¹⁾²⁾	0.022
CN 组				
例数	49	95	76	—
年龄/岁	47.88±11.842	45.73±13.624	46.71±12.521	0.631
BMI/(kg·m ⁻²)	21.547±2.762	21.445±2.565	21.405±2.625	0.957
血钙浓度/(mmol·L ⁻¹)	2.350±0.129	2.321±0.193	2.381±0.129	0.055
尿钙浓度子/(mg·dL ⁻¹)	10.871±2.164	10.468±2.216	10.559±2.270	0.583

与 AA 型组比较,¹⁾P<0.05;与 AG 型组比较,²⁾P<0.05。

表 5 CN 组 and 对照组 CaSR 基因单体型分析

单体型 [*]	单体型频数/%		经验 P 值	校正后 OR 值(95%CI) ^a	校正后 P 值 ^a
	对照组	CN 组			
AACTGAGGCGG	87(34.8)	13(5.8)	<0.001	1.00(ref.)	<0.001
AACTGAGGCAG	15(5.9)	0(0)	0.005	0.93(0.81~1.06)	0.210
AATCAGAGCAA	0(0)	46(21.0)	<0.001	1.57(1.46~1.69)	<0.001
AATCGAAGCAG	20(8.0)	3(1.5)	0.002	0.98(0.86~1.11)	0.729
AATCGAAGCGG	19(7.6)	8(3.8)	0.026	1.16(1.05~1.29)	0.003
AGCTAGGGCAA	21(8.6)	0(0)	0.002	0.87(0.79~0.96)	0.005
AGCTGAGGCGG	10(0.4)	61(27.8)	<0.001	1.55(1.46~1.64)	<0.001
AGTCAGAGCAA	64(25.7)	5(2.3)	0.001	0.95(0.89~1.02)	0.103

注: * 单体型中各位点的顺序: rs9740、rs1501899、rs3749207、rs4678174、rs6776158、rs7652589、rs1042636、rs1801725、rs1801726、rs7632399、rs9883981; ^a 按性别、年龄及体质指数校正后。

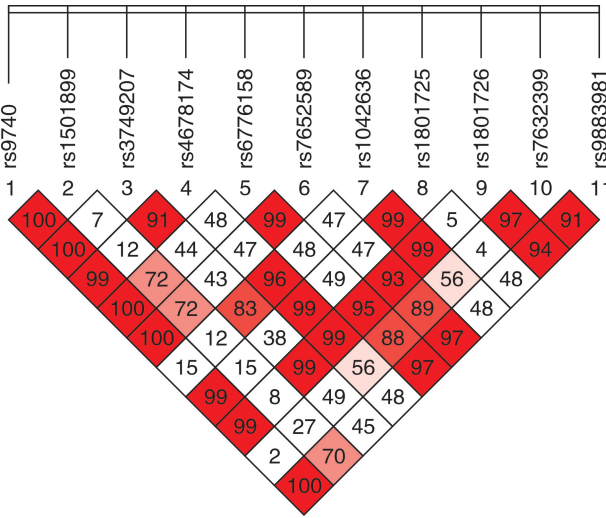
2.4 CaSR 基因 SNP 连锁不平衡分析

CaSR 基 因 rs9740、rs1501899、rs3749207、rs4678174、rs6776158、rs7652589、rs1042636、rs1801725、rs1801726、rs7632399 和 rs9883981 位点基因多态性连锁不平衡图谱(图 1)。连锁不平衡分析结果显示 CaSR 基因 SNP 各位点间存在强连锁不平衡,其连锁不平衡系数 D'见表 6。

3 讨论

钙敏感受体是调节肾小管 Ca²⁺ 浓度的重要蛋白,它包含一个 600 个氨基酸的 NH2 末端细胞外区域、一个由 250 个氨基酸组成的 7 个跨膜区域的核心区域以及一个 200 个氨基酸的细胞内 COOH 末端^[1]。在肾脏,CASR 主要分布在肾小球、近曲小管、近直小管、皮质升支粗段、远曲小管、皮质集合管和内髓质集合管等处^[2]。细胞外离子 Ca²⁺ 浓度上升与肾细胞膜表面 CASR 结合,激活 CASR,活化的 CASR 不仅抑制甲状旁腺激素(parathyroid hormone,PTH)促进的主动重吸收的作用^[3],还可以抑制静息状态时肾皮质髓升支粗段钙的被动

重吸收^[4]。因此,肾细胞膜表面 CASR 的功能状态可以通过影响 Ca²⁺ 的重吸收而影响 CN 的形成。



各方块的颜色由浅至深,表示连锁程度由低到高。

图 1 CaSR SNP 连锁不平衡图谱

表 6 CaSR 基因 SNP 各位点间连锁不平衡系数 D'

D'	SNP2	SNP3	SNP4	SNP5	SNP6	SNP7	SNP8	SNP9	SNP10	SNP11
SNP1	1.00	1.00	0.99	1.00	1.00	0.15	0.99	0.99	0.02	1.00
SNP2	—	0.07	0.12	0.72	0.72	0.12	0.15	0.08	0.27	0.70
SNP3	—	—	0.91	0.44	0.43	0.83	0.38	0.99	0.49	0.45
SNP4	—	—	—	0.48	0.47	0.96	0.99	0.99	0.56	0.48
SNP5	—	—	—	—	0.99	0.48	0.49	0.95	0.88	0.97
SNP6	—	—	—	—	—	0.47	0.47	0.93	0.89	0.97
SNP7	—	—	—	—	—	—	0.99	0.99	0.56	0.48
SNP8	—	—	—	—	—	—	—	0.05	0.04	0.48
SNP9	—	—	—	—	—	—	—	—	0.97	0.94
SNP10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.91

注:CaSR 基因 rs9740(SNP1)、rs1501899(SNP2)、rs3749207(SNP3)、rs4678174(SNP4)、rs6776158(SNP5)、rs7652589(SNP6)、rs1042636(SNP7)、rs1801725(SNP8)、rs1801726(SNP9)、rs7632399(SNP10)和 rs9883981(SNP11)各位点间连锁不平衡系数 D'。

研究表明,CASR 基因的多个多态性位点与特发性高钙血症^[5-8]和 CN^[6-8]的发病风险相关。O'Seaghdha 等^[8-9]研究发现位于外显子 7 Arg 990 Gly SNP(rs1042636,A>G)G 等位基因与不同种族特发性肾结石患病相关,且能够增加原发性甲状旁腺功能亢进症患者含钙肾结石的患病风险。Vezzoli 等^[8]和 Ding 等^[10]发现 CaSR 基因 rs1042636(990Gly)多态性能增加 CaSR 的 Ca²⁺敏感性及尿钙排泄,可能增加含钙肾结石的患病风险。此外,Shakhssalim 等^[5]通过研究 99 例含钙肾结石复发患者及 107 例健康者 CaSR 基因第 7 外显子的 4 个位点进行了分型,发现 rs1801725(986S)、rs1042636(990G)、rs1801726(1011Q)等位基因与伊朗人群肾钙结石复发相关,且 rs1801725(986S)、rs1801726(1011Q)等位基因与伊朗人群高血钙相关。杨奕等^[9]认为,CASR 基因第 7 外显子 R900G 多态性能影响尿钙排泄,可能是特发性高钙尿中调节钙排泄的遗传成分之一。Li 等^[11]认为,CaSR rs7652589 多态性与中国西南地区彝族人群患含钙肾结石的风险显著相关。

目前,有关 CASR 基因多态性的研究主要集中在其第 7 外显子的 3 个位点:rs1801725(A986S)、rs1042636(R900G)、rs1801726(E1011Q)。另外,基因多态性存在种族和地域的差异。江西省赣南地区 95%以上的人口属客家系,具有相对稳定的遗传特点。因此,有必要对江西赣南地区含钙肾结石患者 CaSR 多态性变化进行研究。

本研究表明,CN 组中 CaSR 基因 rs1501899 位点的 G 等位基因率显著高于对照组。与对照组相比,CN 组中 rs1501899 位点纯合子 GG 比例较高。而且,GG 型组尿钙显著比 AA、AG 型组尿钙

高。这提示,CaSR 基因 rs1501899 位点的 G 等位基因、GG 基因型可能促进含钙肾结石的形成。至于其具体机制,有研究表明,CaSR 基因部分多态性可改变 CaSR 蛋白活性或通过基因转录调控影响该基因的表达,改变 CaSR 对 Ca²⁺的敏感性,增加尿钙排泄及肾钙结石发病风险^[12]。另有研究表明,调控区多态性位点上突变后的等位基因是一种八聚体转录因子-1 的结合位点^[13],这种转录因子能够下调维生素 D 依赖基因的转录及 CaSR 的表达。

研究还发现,rs1501899G 等位基因可增加赣南地区人群患含钙结石的风险,OR 值为 1.99;另外,GG/AG 相较 AA 是患含钙结石的危险因子,携带 rs1501899G 等位基因者患含钙结石的风险升高 2.06 倍。通过连锁不平衡分析显示,rs1501899 与 rs9740、rs6776158、rs7652589、rs9883981 有较强的连锁不平衡,对含钙结石发生风险可能存在一定的协同作用。

本研究结果显示 CaSR 基因的 rs9740、rs3749207、rs4678174、rs6776158、rs7652589、rs7632399、rs9883981、rs1801725 (A986S)、rs1042636(R900G)、rs1801726(E1011Q)多态性位点其基因型分布频率在含钙肾患者和正常对照者中差异无统计学意义($P>0.05$)。这与 Shakhssalim 等^[5]和 Vezzoli 等^[8]的研究结果不一致。此外,有研究表明 CaSR 基因第 7 外显子 rs1801725(986S)基因多态性与人群高血钙相关^[14-16],也与本研究结果不一致。这种差异可能与不同种族的遗传背景 and 不同种族间 CASR 基因多态性之间的连锁不平衡模式不同等因素有关。

复杂的性状常常是由多个突变位点共同影响

或决定,其中单体型包含多个 SNPs 的遗传信息,与疾病发生和发展具有更强的相关性^[17]。Vezzoli 等^[18]通过研究 463 例肾结石患者及 213 例健康者及 CaSR 基因 21 个 SNP 位点分型,发现位于调控区 CaSR 基因 CATTCA 单体型与结石发病率显著相关。本研究 CaSR 基因多态性 11 个位点单体型分析发现,AGCTAGGGCAA 单体型与含钙肾结石的形成负相关;而 AATCAGAGCAA、AGCTGAGGCGG 单体型与含钙肾结石的形成正相关。这表明 CaSR 基因单体型 AATCAGAGCAA、AGCTGAGGCGG 有可能会增加人群患含钙肾结石的风险;而 CaSR 基因 AGCTAGGGCAA 单体型有可能会降低人群患含钙肾结石的风险。

总之,CaSR 基因多态性位点 rs1501899 与江西赣南地区含钙肾结石的形成显著相关,纯合子基因 GG 是江西赣南地区人群含钙结石形成的一个危险因素。CaSR 基因单体型 AATCAGAGCAA、AGCTGAGGCGG 有可能会增加人群患含钙结石的风险,而 CaSR 基因 AGCTAGGGCAA 单体型有可能会降低人群患含钙结石的风险。

[参考文献]

- 1 Brown EM, Gamba G, Riccardi D, et al. Cloning and characterization of an extracellular Ca^{2+} -sensing receptor from bovine parathyroid[J]. *Nature*, 1993, 366(6455):575-580.
- 2 Zhang C, Zhuo Y, Moniz H A, et al. Direct determination of multiple ligand interactions with the extracellular domain of the calcium-sensing receptor[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(48):33529-33542.
- 3 Vezzoli G, Terranegra A, Rainone F, et al. Calcium-sensing receptor and calcium kidney stones[J]. *J Transl Med*, 2011, 9(10):201.
- 4 Thakker RV. The calcium-sensing receptor: And its involvement in parathyroid pathology[J]. *Ann Endocrinol (Paris)*, 2015, 76(2):81-83.
- 5 Shakhssalim N, Kazemi B, Basiri A, et al. Association between calcium-sensing receptor gene polymorphisms and recurrent calcium kidney stone disease: a comprehensive gene analysis[J]. *Scand J Urol Nephrol*, 2010, 44(6):406-412.
- 6 O'Seaghdha CM, Yang Q, Glazer NL, et al. Common variants in the calcium-sensing receptor gene are associated with total serum calcium levels[J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(21):4296-4303.
- 7 Hamilton DC, Grover VK, Smith CA, et al. Heterogeneous disease modeling for Hardy-Weinberg disequilibrium in case-control studies: application to renal stones and calcium-sensing receptor polymorphisms[J]. *Ann Hum Genet*, 2009, 73(2):176-183.
- 8 Vezzoli G, Terranegra A, Arcidiacono T, et al. R990G polymorphism of calcium-sensing receptor does produce a gain-of-function and predispose to primary hypercalciuria[J]. *Kidney Int*, 2007, 71(11):1155-1162.
- 9 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.
- 10 Ding Q, Fan B, Shi Y, et al. Calcium-sensing receptor genetic polymorphisms and risk of developing nephrolithiasis in a Chinese population[J]. *Urol Int*, 2017, 99(3):331-337.
- 11 Li H, Zhang J, Long J, et al. Calcium-sensing receptor gene polymorphism(rs7652589) is associated with calcium nephrolithiasis in the population of Yi nationality in Southwestern China[J]. *Ann Hum Genet*, 2018, 82(5):265-271.
- 12 Ba J, Friedman PA. Calcium-sensing receptor regulation of renal mineral ion transport[J]. *Cell Calcium*, 2004, 35(3):229-237.
- 13 Vezzoli G, Macrina L, Magni G, et al. Calcium-sensing receptor: evidence and hypothesis for its role in nephrolithiasis[J]. *Urolithiasis*, 2019, 47(1):23-33.
- 14 Cole DEC, Peltekova VD, Rubin LA, et al. A986S polymorphism of the calcium-sensing receptor and circulating calcium concentrations [J]. *Lancet*, 1999, 353(9147):112-115.
- 15 He Y, Han L, Li W, et al. Effects of the calcium-sensing receptor A986S polymorphism on serum calcium and parathyroid hormone levels in healthy individuals: a meta-analysis[J]. *Gene*, 2012, 491(2):110-115.
- 16 Vezzoli G, Scillitani A, Corbetta S, et al. Polymorphisms at the regulatory regions of the CaSR gene influence stone risk in primary hyperparathyroidism[J]. *Eur J Endocrinol*, 2011, 164(3):421-427.
- 17 De DALR, Primo D. Single nucleotide polymorphisms and clinical nutrition[J]. *Nutr Hosp*, 2017, 34(5):1011-1012.
- 18 Vezzoli G, Terranegra A, Arcidiacono T, et al. Calcium kidney stones are associated with a haplotype of the calcium-sensing receptor gene regulatory region[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2010, 25(7):2245-2252.

(收稿日期:2019-03-21)