مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال بیست و هشتم/شماره ۱۱۹/هفته سوم بهمن ماه ۱۳۸۹
مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۸۹/۹/۲ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۱/۱

بررسی ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم BsmI ژن گیرنده‌ی ویتامین D در بیماران مبتلا به درگیری کلیوی لوپوس

دکتر مهناز عباسی[۱]، دکتر زهرا رضایی یزدی[۲]، دکتر جلیل توکل افشاری[۳]، دکتر محمدرضا هاتف[۲]، دکتر مریم صاحباری[۴]

خلاصه

مقدمه: ویتامین D دارای عملکرد تعدیل سیستم ایمنی است. پلی‌مورفیسم‌های ژن گیرنده‌ی ویتامین D (VDR) موجب تنوع در عملکرد آن می‌شود. گزارش‌هایی در مورد پلی‌مورفیسم BsmI، ژن گیرنده‌ی ویتامین D، با ابتلا به نفریت لوپوس موجود است. این مطالعه جهت بررسی فراوانی ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم BsmI ژن VDR در بیماران با نفریت لوپوسی انجام شد.

روش‌ها: ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم BsmI ژن VDR به روش PCR/RFLP در ۲۹ بیمار مبتلا به نفریت لوپوس بررسی شد.

یافته‌ها: در این بیماران، ژنوتیپ‌های BB در ۶ نفر (۲۰/۶ درصد) و Bb در ۱۵ نفر (۵۱/۷ درصد) و bb در ۸ نفر (۲۷/۵ درصد) بود که تفاوت آماری معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها وجود نداشت (P = ۰/۰۹۰). در ۲۱ بیمار بیوپسی کلیه انجام شد که شایع‌ترین ژنوتیپ Bb (۴۲/۸ درصد)بود. اختلاف معنی‌داری بین تیپ گرفتاری بافت کلیه در بیوپسی با ژنوتیپ‌های مختلف گیرنده‌ی ویتامین D وجود نداشت (P = ۰/۰۶۷).

نتیجه گیری: در این مطالعه، پلی‌مورفیسم BsmI ژن VDR با ابتلای کلیوی بیماری ارتباط نداشت.

واژگان کلیدی: نفریت لوپوسی، BsmI، ژن گیرنده‌ی ویتامین D.

مقدمه

لوپوس اریتماتوز سیستمیک (SLE) یک بیماری خود ایمن بافت همبند با ابتلای ارگان‌های متعدد است. علت این بیماری هنوز تحت بررسی می‌باشد. تظاهرات بالینی و آزمایشگاهی آن بسیار متنوع است و ابتلای ارگان‌های حیاتی مانند کلیه از ویژگی‌های مهم این بیماری محسوب می‌شود (۱). عوامل سبب‌زای متعددی مانند اختلالات هورمونی، عوامل محیطی و ژنتیکی در بیماری‌زایی لوپوس مطرح هستند (۲).

در تحقیقات جدید، نقش تعدیل کننده‌ی ایمنی ویتامین D مورد توجه قرار گرفته است. مطالعات متعدد نشان داده است که ویتامن D می‌تواند باعث تعدیل سیتوکین‌ها شود و تعادل سیستم ایمنی را از سمت Th1 به Th2 هدایت کند. بررسی‌ها حاکی از آن است که این ویتامین قادر است تجمع mRNA برای تولید IFN-γ، IL_2 و GMCSF را در سلول‌ها مهار کند (۵-۳). در برخی مطالعات، سطوح پایین‌تر 1,25 (OH)2D3 در بیماران مبتلا به لوپوس نسبت به افراد سالم گزارش شده است (۶).

ژن گیرنده‌ی ویتامین D بر روی سلول‌های سیستم

[۱] استادیار، گروه روماتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی و عضو مرکز تحقیقات بیماری‌های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.
[۲] دانشیار، گروه روماتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی و عضو مرکز تحقیقات بیماری‌های روماتیسمی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
[۳] دانشیار، گروه ایمنی شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و عضو مرکز تحقیقات بیماری‌های ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
[۴] استادیار، گروه روماتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی و عضو مرکز تحقیقات بیماری‌های روماتیسمی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر زهرا رضایی یزدی
Email: rezaieyazdiz@mums.ac.ir

www.mui.ac.ir

ایمنی وجود دارد و در هدایت مسیرهای ایمنی نقش مهمی ایفا می‌کند. به نظر می‌رسد واریان‌های آللی گیرنده‌ی ویتامین D در عملکرد کامل آن به عنوان مهار کننده‌ی اختلالات ایمنی دخالت می‌کنند (۷). پلی‌مورفیسم در اینترون ۸ یا BsmI از شایع‌ترین پلی‌مورفیسم‌هایی است که در ژن گیرنده‌ی ویتامین D بررسی شده است (۹-۷). نتایج متفاوتی در مورد ارتباط ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم BsmI و نفریت لوپوسی گزارش شده است (۹-۷)؛ از جمله، تمایل به بروز نفریت لوپوسی در ژنوتیپ BB در مطالعه‌ی Huang و همکاران (۹) و ارتباط مثبت بین ژنوتیپ bb و وقوع سندرم نفروتیک در مطالعه‌ی Ozaki و همکاران گزارش شده است (۷). از آن جا که تفاوت‌های ژنی در جمعیت‌های مختلف می‌تواند عامل مهمی در بروز تظاهرات متفاوت بیماری باشد و نیز نقش درمان با ویتامین D از موضوعات مهم مورد تحقیق در بیماری لوپوس است، این مطالعه برای بررسی ارتباط ژنوتیپ‌های مختلف پلی‌مورفیسم BSMI ژن گیرنده‌ی ویتامین D در بیماران مبتلا به درگیری کلیوی لوپوس طراحی شد.

روش‌ها

۶۰ بیمار مبتلا به بیماری لوپوس اهل استان خراسان رضوی، که تشخیص بیماری در آنان بر اساس معیارهای انجمن روماتیسم آمریکا (ACR) (۱) قطعی شده بود، وارد مطالعه شدند. روش نمونه گیری به صورت سرشماری از بین بیماران بستری و سرپایی بیمارستان‌های قائم (عج) و امام رضا (ع) از آذرماه ۱۳۸۵ تا خرداد ۱۳۸۶ بود. ابتلای کلیوی بر حسب کرایتریاهای ACR با دفع بیش از ۵۰۰ میلی‌گرم پروتئین در نمونه‌ی جمع آوری ادرار ۲۴ ساعته و یا وجود کست‌های سلولی یا گرانولر در ادرار تعریف شد؛ ضمن این که سایر معیارهای رسوب ادراری فعال شامل هماچوری و پیوری در غیاب عفونت ادراری نیز بررسی گردید.

از بیمارانی که مایل به شرکت در این تحقیق بودند، پس از تکمیل فرم رضایت‌نامه، ۵ سی‌سی خون وریدی گرفته و در لوله‌های حاوی ماده‌ی ضد انعقادی ریخته شد. DNA از نمونه‌ها با روش Salting out با کیت استخراج DNA (بیوژن- ایران) استخراج شد. تست‌های بررسی فعالیت بیماری شامل شمارش سلول‌های خونی و آزمایش نمونه‌ی کامل ادرار و سنجش کمپلمان‌های سرم نیز هم‌زمان بر روی نمونه‌ها صورت گرفت.

PCR DNA به روی نمونه‌های DNA انجام و از سکانس پرایمر زیر استفاده شد.

Forward: 5’ AAC TTG CAT GAG GAG GAG CAT GTC3’
Backward: 5’ GGA GAG GAG CCT GTG TCC CAT TAG3’

طول باند محصول PCR برابر با ۸۱۳ bp بود که با آنزیم Mval 269 I(BSMI) (Fermentus- Canada) برش خورد تا قطعات ۴۷۷ bp و ۳۱۸ bp استخراج شود.

ژنوتیپ آلل‌ها شامل هموزیگوت bb (هر دو آلل برش خورده)، هموزیگوت BB (هر دو آلل برش نخورده) و هتروزیگوت Bb (یک آلل برش خورده و دیگری برش نخورده) بود.

اطلاعات به دست آمده از طریق نرم‌افزار آماری SPSS$_{11/5}$ (version 13, SPSS Inc., Chicago, IL)

www.mui.ac.ir

مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

این مطالعه مورد تأیید کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مشهد قرار گرفت.

یافته‌ها

از ۶۰ بیمار مبتلا به لوپوس با توزیع سنی بین ۱۵ تا ۵۳ سال، ۲۹ نفر مبتلا به نفریت بودند (۴۸/۳ درصد) که در نمونه‌ی ادرار ۲۴ ساعته پروتئینوری بیشتر از ۵۰۰ میلی‌گرم و یا کست‌های ادراری (سلولی- گرانولر) داشتند. از این تعداد، ۶ بیمار (۲۰/۶ درصد) ژنوتیپ BB، ۱۵ بیمار (۵۱/۷ درصد) ژنوتیپ Bb و ۸ بیمار (۲۷/۵ درصد) ژنوتیپ bb داشتند که اختلاف آماری بین ژنوتیپ‌های مختلف معنی‌دار نبود (P = ۰/۰۹۰).

میزان سرمی کمپلمان‌ها و تیتر Anti dsDNA و وجود گلبول‌های قرمز و سفید در غیاب عفونت نیز بررسی شد که نتایج در جداول ۱ و ۲ آورده شده است.

از ۲۹ بیمار با درگیری کلیوی، در ۲۱ نفر بیوپسی کلیه در زمان مطالعه انجام شد یا بلوک‌های بیوپسی‌های قبلی بازبینی شد و بیماران با ژنوتیپ‌های مختلف از نظر تیپ گرفتاری بافت کلیه در بیوپسی نیز با هم مقایسه شدند؛ نتیجه در جدول ۳ آورده شده است. مشاهده می‌شود که اختلاف معنی‌داری از این نظر بین ژنوتیپ‌های مختلف وجود نداشت.

جدول ۱. توزیع فراوانی بیماران مبتلا به لوپوس تحت مطالعه بر حسب ژنوتیپ و تست‌های آزمایشگاهی انجام شده

تست‌های آزمایشگاهی انجام شده	BB		Bb		bb		نتیجه‌ی آزمون χ^2
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
Anti dsDNA افزایش یافته	۱۲	۲۴/۰	۲۹	۵۸/۰	۹	۱۸/۰	P = ۰/۷۴۹
کمپلمان کاهش یافته	۷	۲۲/۶	۱۹	۶۱/۳	۵	۱۶/۱	P = ۰/۹۷۸
پیوری	۶	۲۸/۵۷	۱۱	۵۲/۴	۴	۱۹/۰۴	P = ۰/۶۷۵
هماچوری	۶	۲۸/۵۷	۱۳	۶۱/۹	۲	۹/۵۲	P = ۰/۴۴۹
پروتئینوری بیشتر از ۵۰۰ میلی‌گرم در ۲۴ ساعت	۶	۲۳/۰۷	۱۳	۵۰/۰	۷	۲۶/۹۲	P = ۰/۱۸۱

جدول۲. توزیع فراوانی بیماران تحت مطالعه بر حسب ژنوتیپ و میزان دفع پروتئین

پروتئین ادرار ۲۴ ساعته	BB		Bb		bb		نتیجه‌ی آزمون χ^2
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
۵۰۰ > میلی‌گرم	۸	۲۳/۵	۲۳	۶۷/۶۴	۳	۸/۸۲	P = ۰/۱۰۱
۱۰۰۰-۵۰۰ میلی‌گرم	۲	۱۸/۲	۴	۳۶/۴	۵	۴۵/۴	
۳۴۹۹-۱۰۰۱ میلی‌گرم	۳	۲۵/۰	۷	۵۸/۳	۲	۱۶/۷	
۳۵۰۰ ≤ میلی‌گرم	۱	۳۳/۳	۲	۱۱/۱	۰	۰	
کل	۱۴	۱۰۰/۰	۳۶	۱۰۰/۰	۱۰	۱۰۰/۰	

www.mui.ac.ir

جدول ۳. توزیع فراوانی بیماران مبتلا به نفریت لوپوس تحت مطالعه بر حسب تیپ درگیری کلیه در بیوپسی و ژنوتیپ

بیوپسی کلیه	BB		Bb		Bb		کل		نتیجه‌ی
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	آزمون χ^2
تیپ I	۰	۰	۰	۰	۱	۴/۷	۱	۴/۷	P = ۰/۰۶۷
تیپ II	۰	۰	۲	۹/۵	۱	۴/۷	۳	۱۴/۲	
تیپ III	۰	۰	۰	۰	۱	۴/۷	۱	۴/۷	
تیپ IV	۴	۱۹/۰	۹	۴۲/۸	۲	۹/۵	۱۵	۷۱/۴	
تیپ V	۰	۰	۰	۰	۱	۴/۷	۱	۴/۷	
کل	۴	۱۹/۰	۱۱	۵۲/۳	۶	۲۸/۵	۲۱	۱۰۰/۰	

بحث

هدف این مطالعه، بررسی ارتباط احتمالی ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم ژن گیرنده‌ی ویتامین D با درگیری کلیوی لوپوس بود؛ چرا که در مطالعات قبلی انجام شده یک سری ارتباطات ذکر شده بود.

از جمله Ozaki و همکاران (۷) گزارش می‌کنند که با این که ژنوتیپ BB فراوانی بیشتری در بیماران مبتلا به لوپوس داشته است ولی در افراد مبتلا به لوپوس با نفریت، بیشترین ژنوتیپ گزارش شده bb بوده است؛ یعنی ارتباط مثبتی بین ژنوتیپ bb و وقوع سندرم نفروتیک گزارش شده است. البته در دو مطالعه‌ی Sakulpipatsin و همکاران (۸) و Huang و همکاران (۹) اختلاف آماری معنی‌داری از نظر درگیری کلیوی بین ژنوتیپ‌های مختلف گزارش نشده است؛ در مطالعه‌ی Huang و همکاران (۹)، بر خلاف آمار مطالعه‌ی Ozaki و همکاران (۷)، تمایل به بروز نفریت لوپوسی در ژنوتیپ BB (۱۰۰ درصد) در مقایسه با bb (۴۱/۷ درصد) بیشتر گزارش شده است؛ ولی در مطالعه‌ی ما هیچ اختلاف معنی‌داری از نظر میزان درگیری کلیوی و میزان پروتئینوری و بروز پروتئینوری در حد سندرم نفروتیک بین ژنوتیپ‌های مختلف وجود نداشت .

در این مطالعه، ارتباط بین ژنوتیپ‌ها و افزایش تیتر Anti ds DNA و تیتر کاهش یافته‌ی کمپلمان نیز بررسی شد و اختلاف آماری معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های مختلف پیدا نشد؛ درحالی که در مطالعه‌ی Ozaki و همکاران (۷)، با این که بین افزایش تیتر Anti ds DNA و بروز نفریت ارتباط وجود داشت ولی بین تیتر آنتی‌بادی و ژنوتیپ‌ها ارتباط معنی‌داری یافت نشد. هر چند افراد با ژنوتیپ bb، که بیشترین درصد ابتلای کلیه را داشتند، دارای سطح سرمی بالاتری از آنتی‌بادی بودند؛ نویسندگان مقاله بر این اساس نتیجه گرفتند که هر چند ژنوتیپ‌های ژن گیرنده‌ی ویتامین D به طور مستقیم در تولید Anti ds DNA دخالت ندارد ولی ممکن است به طور غیرمستقیم در تولید آن دخیل باشد (۷) که در مطالعه‌ی ما نتایج مشابهی یافت نشد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های مختلف پلی‌مورفیسم BsmI ژن گیرنده‌ی ویتامین D و درگیری کلیوی در بیماران مبتلا به لوپوس مورد مطالعه، که همگی ایرانی و متعلق به منطقه‌ی شمال شرقی کشورمان، یعنی استان خراسان بودند، پیدا نشد.

www.mui.ac.ir

References

1. Edwolthy SM. Clinical manifestation of systemic lupus erythematosus. In: Harris E, Budd R, Firestein G, Genovese M, Sergent J, Ruddy S, et al. Kelley's text book of rheumatology. 7th ed. Philadelphia: WB. Saunders. 2005. p. 1105-23.
2. Peterson K, Winchester R. Systemic Lupus Erythematosus: pathogenesis. In: Koopman WJ, Moreland LW, Editors. Arthritis and allied condition, a textbook of rheumatology. 15th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2005. p. 1523-6.
3. Albert PJ, Proal AD, Marshall TG. Vitamin D: the alternative hypothesis. Autoimmun Rev 2009; 8(8): 639-44.
4. Lemire JM, Adams JS, Kermani-Arab V, Bakke AC, Sakai R, Jordan SC. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 suppresses human T helper/inducer lymphocyte activity in vitro. J Immunol 1985; 134(5): 3032-5.
5. Bhalla AK, Amento EP, Krane SM. Differential effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 on human lymphocytes and monocyte/macrophages: Inhibition of interleukin-2 and augmentation of interleukin-1 production. Cell Immunol 1986; 98(2): 311-22.
6. Müller K, Kriegbaum NJ, Baslund B, Sørensen OH, Thymann M, Bentzen K. Vitamin D3 metabolism in patients with rheumatic diseases: low serum levels of 25-hydroxyvitamin D3 in patients with systemic lupus erythematosus. Clin Rheumatol 1995; 14(4): 397-400.
7. Ozaki Y, Nomura S, Nagahama M, Yoshimura C, Kagawa H, Fukuhara S. Vitamin-D receptor genotype and renal disorder in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. Nephron 2000; 85(1): 86-91.
8. Sakulpipatsin W, Verasertniyom O, Nantiruj K, Totemchokchyakarn K, Lertsrisatit P, Janwityanujit S. Vitamin D receptor gene BsmI polymorphisms in Thai patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Res Ther 2006; 8(2): R48.
9. Huang CM, Wu MC, Wu JY, Tsai FJ. Association of vitamin D receptor gene BsmI polymorphisms in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. Lupus 2002; 11(1): 31-4.

www.mui.ac.ir

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 28. No 119. 3rd week. February 2011 Received: 23.11.2010 Accepted: 21.1.2011

Vitamin D Receptor (VDR) Gene BsmI Polymorphisms in Lupus Nephritis

Mahnaz Abbasi MD[1], Zahra Rezaieyazdi MD[2], Jalil Tavakol afshari PhD[3], Mohammadreza Hatef MD[2], Maryam Sahebari MD[4]

Abstract

Background: Vitamin D has immunomodulatory function. Polymorphisms of the gene encoding the vitamin D receptor detected by BsmI may be source of diversity in its action. An association between vitamin D receptor gene BsmI polymorphisms and lupus nephritis has been reported. This study was performed to evaluate vitamin D receptor gene BsmI polymorphisms in lupus nephritis.

Methods: Twenty nine patients with lupus nephritis enrolled in this study. Vitamin D receptor gene typing was performed based on polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism.

Finding: Vitamin D receptor genotyping of BsmI polymorphisms was 20.6% for BB, 51.7% for Bb, and 27.5% for bb without statistically significant difference (P = 0.090). In 21 patients that renal biopsy was done, the Bb genotype was the most (42.8%). There was not any correlation between renal histology and vitamin D receptor gene BsmI polymorphisms (P = 0.068).

Conclusion: There was no relationship between vitamin D receptor gene BsmI polymorphisms and lupus nephritis.

Keywords: Vitamin D receptor gene, BsmI, Lupus nephritis.

[1] Assistant Professor, Metabolic Research Center, Department of Rheumatology, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran.
[2] Associate Professor, Rheumatic Diseases Research Center, Department of Rheumatology, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
[3] Associate Professor, Immunology Research Center, Department of Immunology, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
[4] Assistant Professor, Rheumatic Diseases Research Center, Department of Rheumatology, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
Corresponding Author: Zahra Rezaieyazdi MD, Email: rezaieyazdiz@mums.ac.ir

www.mui.ac.ir