

降钙素受体基因多态性与老年男性骨密度关系

李东风^{1,2}, 蔡雪珍^{1,2}, 杨燕红², 吴文², 黄小穗^{1,2}, 董婷^{1,2}, 林凯², 智喜梅²
(1. 广东省人民医院医学研究中心, 2. 广东省老年医学研究所, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨降钙素受体基因(CTR)C1377T 基因多态性与老年男性人群骨密度相互关系。【方法】选取年龄 65 岁广州地区汉族男性个体 247 例,采用双能 X 线吸收法(DEXA)测定其全身、腰椎 2~4(L2-4)、股骨颈(Neck)、粗隆间(Inter)、Ward'三角和大转子(Troch)区等部位的骨密度(BMD)值,并采用聚合酶链反应限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术检测外周血白细胞基因组降钙素受体基因多态性。【结果】247 例受试对象中,CTR 基因型分别为 CC 型 205 例(83.0%),CT 型 39 例(15.8%),TT 型 3 例(1.2%);基因频率 CC 型为 90.9%,TT 型为 9.1%,基因型分布符合 Hardy-weinberg 定律。分析其基因型与骨密度的关系显示,含有酶切位点的个体(CT+TT)除在腰椎侧位(L2-L4)及 Ward'三角(Ward's)的骨密度比不含酶切位点的基因型的骨密度值有显著性升高外(P<0.05),其他部位骨密度值之间的差异无统计学意义。【结论】降钙素基因 C1377T 基因多态性尚不能作为预测汉族老年男性发生骨质疏松危险性的遗传标志

关键词: 降钙素受体; 基因多态性; 骨密度; 老年病学; 男性

中图分类号: R394

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)04-0410-04

Association Between Calcitonin Receptor Gene Polymorphism and Bone Mineral Density in Elderly Men

LI Dong-feng^{1,2}, CAI Xue-zhen^{1,2}, YANG Yan-hong², WU Wen², HUANG Xiao-sui^{1,2}, DONG Ting^{1,2},
LIN Kai², ZHI Xi-mei²

(1. Research Center of Medical Science, Guangdong Provincial People's Hospital, 2. Guangdong Provincial Institute of Geriatric Medicine, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the C1377T polymorphisms of calcitonin receptor (CTR) in Chinese elderly men and to study the relationship between the polymorphisms and bone mineral density (BMD). 【Methods】 A total of 247 old men from Han nationality in Guangzhou area (aged 65~83 years) were recruited. The genotype of CTR gene was examined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RELP). BMD was measured at total body (Total), femoral neck (Neck), lumbar spine (L2-4), trochanter (Troch) and ward s triangle (Ward s) using dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA). 【Results】 The distribution of CTR were: CC genotype 205 (83.0%), CT 39 (15.8%), TT 3 (1.2%) and the frequencies of allele C and T were 90.9% and 9.1%, respectively. Both frequencies distribution of CTR gene and gene alleles were all in the Hardy-Weinberg equilibrium. Subjects with presence of T allele (CT and TT genotype) group had higher BMD only at lumbar spine (L2-L4) and Ward s triangle (Ward s) sites than subjects in absence of T allele (CC genotype) group (P<0.05). The mean BMD was no significant difference at the other sites. 【Conclusion】 There is no relationship between genotype of CTR gene and BMD for most site of body. CTR genotype may not be used as genetic marker in predicting the risk of developing osteoporosis.

Key words: calcitonin receptor; gene polymorphism; bone mineral density; geriatrics; men

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(4):410-413]

骨质疏松是一种多基因调控复杂性常见病, 遗传因素在骨质疏松的发病机制中起重要作用,

收稿日期: 2005-12-15

基金项目: 广东省重点攻关项目(2001C30706; 2002B31101)

作者简介: 李东风(1962-),女,河南驻马店人,助理研究员,主要从事细胞遗传学研究. E-mail:xxkldfxjx@163.com

它决定了80%以上骨密度的差异^[1]。自1994年Morrison等^[2]首次提出维生素D受体等位基因与骨密度预测骨密度以来,各国学者又相继发现了另外一些候选基因。由于降钙素是已知的调节骨代谢的三大重要激素之一,它通过与破骨细胞上的降钙素受体(calcitonin receptor, CTR)结合以抑制骨吸收,因而CTR基因日益受到人们的关注。本文采用聚合酶链反应限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术,检测广州地区部分汉族老年男性人群降钙素基因C1377T基因多态性,并进行骨密度(bone mineral density, BMD)测定,旨在探讨CTR基因多态性与BMD的相互关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

通过对来我院门诊就诊及住院人员宣传招募自愿受试者,并随机筛选年龄 ≥ 65 岁,无亲缘关系的广州地区汉族男性自愿受试者300例,对所有自愿者先行流行病学调查及实验室常规检查,对患有(或曾患有)与骨代谢相关疾病,如严重肝、肾脏疾病、类风湿等(骨质疏松症及骨折除外)及正服用可能影响骨代谢药物如将降钙素、二磷酸盐、维生素D、氟化物及雌激素者等予以排除。在此基础上,247例入选。受试者年龄(71.4 ± 5.6)岁($65 \sim 86$ 岁),居住广州地区23年以上。

1.2 实验方法

1.2.1 骨密度测定 采用双能X线吸收骨密度dual-energy X-ray absorption (DEXA)测定方法测受试者全身(total)、次全身(subtot)、腰椎侧位(L2-L4)、股骨颈(neck)、粗隆间(Inter)、大转子(troch)、Ward's三角(Ward's)等部位骨密度值。本仪器随机附带统计软件包,对年龄、体质量指数等影响骨密度因素进行修正。

1.2.2 基因多态性分析 基因组DNA提取:早晨取空腹外周静脉血4 mL, EDTA抗凝,常规盐析法提取基因组DNA。PCR扩增:50 μ L反应体系包含以下组成成分:50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-Cl (pH 8.3), 0.1 g/L 明胶, 1.5 mmol/L MgCl₂, 200 μ mol/L dNTP, Taq酶2 U (以上产品均为TOYOBO公司提供), 基因组DNA 200 ng, 上下游引物各0.25 μ mol/L。引物由北京赛百胜基因技术有限公司合成。CTR引物^[2]上游:5'-TTCAGTGGAACC AGC

GTTGG-3', 下游:5'-CTCAGTGATCACGATACTGTG-3'。反应条件:95 $^{\circ}$ C 5 min 预变性,随后进行三温循环:95 $^{\circ}$ C 30 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s。40个循环结束后,72 $^{\circ}$ C再延伸5 min。扩增产物检查:扩增完毕后,取10 μ L扩增产物,经25 g/L琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,紫外灯下观察,以确定扩增是否成功,以100 bp DNA ladder(北京天为时代科技有限公司提供)为分子质量标准。CTR基因分型:取扩增产物20 μ L,加入Alu I内切酶(NEB公司提供)3 U, 37 $^{\circ}$ C恒温水浴。16 h后,取10 μ L酶切产物,经40 g/L琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,紫外灯下观察。

1.3 统计学分析

采用SPSS10.0统计软件,根据Hardy-weinberg平衡定律计算各基因型个体数的期望值,CTR等位基因分布的Hardy-weinberg平衡吻合性检验、组间基因型频率及等位基因频率的差异性比较采用 χ^2 检验;计量数据的统计描述 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本t检验方法比较各基因间的计量资料。检验水准 $\alpha=0.05$

2 结果

2.1 一般资料分析

247例志愿受试者参加研究,平均年龄(72 ± 6)岁,身高(169 ± 8) cm,体质量(61 ± 11) kg。各部位骨密度值如下:全身(0.97 ± 0.12) g/cm²,次全身(0.83 ± 0.12) g/cm²,腰椎侧位(0.66 ± 0.17) g/cm²,股骨颈(0.64 ± 0.12) g/cm²,粗隆间(0.86 ± 0.16) g/cm²,大转子(0.52 ± 0.16) g/cm²,Ward's三角(0.41 ± 0.12) g/cm²。

2.2 CTR基因型分布

本文所采用的引物扩增的产物为包含CTR分子第1377 bp多态性位点DNA片段,长度为228 bp。扩增的PCR产物经Alu I内切酶作用后,如果只出现120 bp和108 bp大小的两个片段,习惯上就把该个体称之为TT基因型,相应地,当扩增产物缺乏Alu I酶切位点,电泳后只能看到228 bp一条带,该携带者被称为CC基因型;如果酶切后经电泳可同时看到228、120、108 bp三条带,该基因型就为CT杂合子(图1)。

本次检测的247例老年男性人群中,CC型205例(83.0%);CT型39例(15.8%);TT型3例

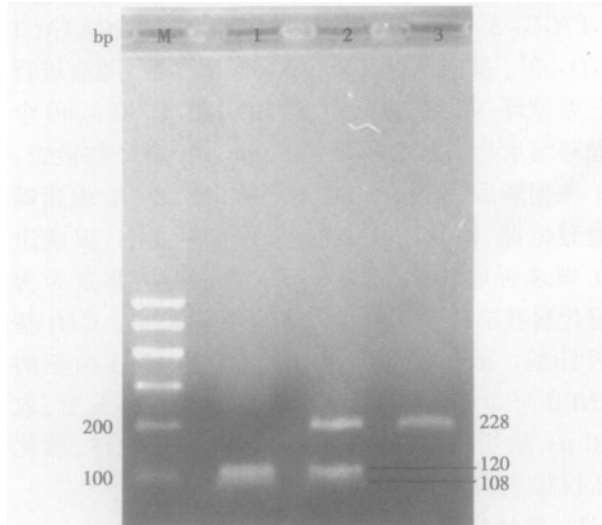


图 1 CTR 基因 PCR 产物酶切电泳

Fig.1 PCR products of CTR gene

M:DL100 Marker; 1: TT genotype; 2: CT genotype; 3: CC genotype

(1.2%)。CT 等位基因频率分别为 90.9%、9.1%，经 χ^2 检验 CTR 各基因型及等位基因频率基因频率分布均符合 Hardy-Weinberg 定律。

2.3 CTR 基因多态性与骨密度相互关系

本次受试的 247 例老年男性个体，CC 型 205 例，CT 型 39 例，TT 型 3 例。由于 TT 型个体数量过少，故将基因型分为不含 Alu 酶切位点组(CC 基因型)和含有 Alu 酶切位点组(CT 基因型+TT 基因型)。对他们骨密度值进行统计比较后发现，含有酶切位点的个体在各部位均拥有较高的骨密度值，但只在腰椎侧位(L2-L4)及 Ward' 三角(Ward's)处骨密度值有统计学意义(表 1)。

表 1 广州地区老年男性人群 CTR 基因型的骨密度值
Table 1 BMD values in different CTR genotypes in elderly men in Guangzhou

Genotype	CC (n=205)	CT+TT (n=42)	t	P
Age	72 ± 6	70 ± 5	1.21	0.23
BMD(g/cm ²)				
Total	0.96 ± 0.11	0.99 ± 0.14	1.35	0.18
Subtotal	0.83 ± 0.11	0.86 ± 0.14	1.31	0.19
L2- L4	0.65 ± 0.13	0.74 ± 0.23 ¹⁾	2.37	0.02
Neck	0.64 ± 0.11	0.67 ± 0.14	1.26	0.21
Troch	0.55 ± 0.10	0.55 ± 0.15	1.46	0.15
Inter	0.85 ± 0.16	0.89 ± 0.18	0.76	0.45
Ward's	0.41 ± 0.08	0.48 ± 0.16 ¹⁾	2.22	0.03

1)Independent sample t- test, P<0.05

3 讨 论

人类降钙素受体基因位于染色体 7q21.3 上，其分子质量为 8-9 ku，由 490 个氨基酸残基组成。CTR 是 7 个跨膜 G 蛋白结合受体家族的成员之一。CTR 主要分布在破骨细胞及其前体细胞、肾小管上皮睾丸、子宫等组织上，它的主要功能是调节体内骨代谢和维持钙平衡。CTR 基因多态性是其第 1377 bpC 突变为 T 导致其编码的蛋白质的第 447 位氨基酸残基由脯氨酸 (CCG) 为亮氨酸 (CTG)。该核苷酸突变可能通过改变 CTR 分子的二级结构而使 CTR 与配体的结合受到影响，并改变信号传导特性，从而影响靶细胞对降钙素的反应^[3]。而降钙素是人体调节骨转换的重要激素之一，它通过抑制破骨细胞的骨吸收及促进成骨细胞的骨形成而维持骨量的稳定。

对广州地区 247 名汉族老年男性 CTR 基因 C1377T 基因多态性研究显示，该基因 C1377T 位点等位基因频率分布符合 Hardy-Weinberg 定律。该结果与报道的北京^[4]及上海妇女人群^[5]的分布频率相一致，与日本人^[6]也相似，绝大多数个体为 CC 基因型，TT 比例最低。但与高加索人明显不同^[7]，高加索妇女人群中 CC 基因型最少，说明 CTR 基因多态性频率在不同的种族中分布存在特异性。

以往对 CTR 基因多态性与骨密度之间关系的研究多集中于绝经后妇女人群^[4-6]，对 CTR 基因多态性与老年男性骨质疏松之间的关系少有关注。但由于绝经后妇女 BMD 值的下降与多种因素尤其雌激素水平的下降有关。因此，它们可能不能全面揭示所有类型骨质疏松的发病机理。而男性骨质疏松隶属于原发性 II 型骨质疏松。因此本课题研究老年男性人群 CTR 基因多态性与 BMD 的相互关系，从一个侧面了解原发性骨质疏松中 II 型骨质疏松症即男性骨质疏松症发病机制，并找寻筛查高危人群的有效手段及早进行预防和干预。

本实验研究结果表明，CTR 基因 CC 型、CT 型及 TT 型 3 组在年龄分布上无统计学上的差异，由于所检测到的 TT 基因型个体数量过少，故将本次受试的人群划分为含有酶切位点的组 (CT 基因型+TT 基因型) 与不含酶切位点组 (CC 基因型)。对他们的 BMD 值进行统计学分析后发现，在腰椎侧位及 Ward's 三角等部位，含有 Alu 酶切位点

基因型个体携带的骨密度值比不含酶切位点的组有统计学意义升高。本次检测结果还显示,含有酶切位点的个体在其他部位也携带了较高的骨密度值,尽管它们没有统计学意义上的差别,这是否意味着,CTR 基因编码第 447 位为亮氨酸的降钙素,比该位点为脯氨酸的降钙素分子,对防止钙的丢失,维持骨量更为有利。关于这点,仍需要通过扩大检测人群范围及进行更深入的研究证实。

参考文献:

- [1] POOCOCK N A, EISMAN J A, HOPPER J L, et al. Genetic determinants of bone mass in adults[J]. *J Clin Invest*, 1987,80(3):706-710.
- [2] MORRISON N A, QIJC, TOKITA A, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles [J]. *Nature*, 1994,367(6460):284-287.
- [3] SHYU J F, INOUE D, BARON R, et al. The deletion of 14 amino acids in the seventh transmembrane domain of a naturally occurring calcitonin receptor isoform alters ligand binding and selectively abolishes coupling to phosphodiesterase[J]. *Biol Chem*, 1996,271(49):31127-31134.
- [4] 章振林,孟迅吾,周学瀛,等.北京地区汉族妇女维生素 D 受体基因和降钙素受体基因多态性与骨密度的关系[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2003, 18(2): 90-94.
- [5] 赵红燕,刘建民,宁光,等.钙素受体基因多态性与上海地区妇女骨密度的关系[J]. *中国医学科学院学报* 2003, 25(3):258-261.
- [6] NAKAMURA M, MORIMOTO S, ZHANG Z, et al. Calcitonin receptor gene polymorphism in Japanese women: correlation with body mass and bone mineral density[J]. *Calcif Tissue Int*, 2001, 68(4):211-215.
- [7] MASI L, BECHERINI L, GENNARI L, et al. Allelic variants of human calcitonin receptor: distribution and association with bone mass in postmenopausal Italian women[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 245(2): 622-626.
- [8] 李东风,吴文,蔡雪珍,等.降钙素受体基因多态性与广州地区绝经后妇女骨密度关系研究[J]. *华南预防医学*, 2005, 31(6):12-14.
- (编辑 张敏瑞)
-
- (上接第 404 页 from page 404)
- epitope-specific cytotoxic T lymphocytes in active chronic viral hepatitis B infection by using MHC class I peptide tetramers[J]. *Immunol Lett*, 2004, 92(3):253-258.
- [10] 朴文花,何豫,席宏丽,等. HLA-A2 肽四聚体的构建及其在乙、丙型肝炎中的初步应用[J]. *中华医学杂志*, 2004,84(21): 1818-1822.
- [11] 范振平,王福生,徐东平,等.乙型肝炎患者 HBcAg 特异性细胞毒性 T 细胞的检测及其与临床疾病状态的关系[J]. *中华医学杂志*, 2004, 84(24): 2073-2076.
- [12] 王洪,周吉军,夏杰,等. MHC-表位肽四聚体技术在病毒性肝炎研究中的应用[J]. *世界华人消化杂志*, 2004,12(6):1432-1436.
- [13] KAKIMI K, LANE T E, WIELAND S, et al. Blocking chemokine responsive to γ -IFN-inducible protein and monokine induced by IFN- γ activity in vivo reduces the pathogenesis but the antiviral potential of hepatitis B virus specific cytotoxic T lymphocytes [J]. *J Exp Med*, 2001,194(12):1755-1766.
- [14] LIN S M, SHEEN I S, CHIEN R N, et al. Long-term beneficial effect of interferon therapy in patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. *Hepatology*, 1999, 29(3):971-975.
- [15] 林炳亮,黄桂梅,林潮双,等.胸腺肽 α_1 促进拉米夫定抗乙型肝炎病毒的疗效[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2003,24(5):488-3491.
- [16] LAU D T, KHOKHAR M F, DOO E, et al. Long-term therapy of chronic hepatitis B with lamivudine [J]. *Hepatology*, 2000,32(4 Pt1):828-834.
- (编辑 黄小延)