

维生素 D 受体基因多态性与骨质疏松症

梁 伟, 修玲玲, 梁奕铨, 余斌杰

(中山医科大学附属第一医院内分泌科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】了解广州地区汉族人群中维生素 D 受体(VDR)基因型的分布, 探讨 VDR 基因多态性与骨质疏松症的关系。【方法】应用 PCR-RFLP 等技术, 对广州地区汉族人群中 VDR 基因型的分布及其与骨质疏松症的易感性进行分析。【结果】VDR 基因多态性在人群中的分布有种族差异, 广州地区汉族人群中 'B、A、t' 等位基因的出现频率较低, 原发性骨质疏松组及 2 型糖尿病并骨质疏松组中 'A' 等位基因在股骨与高骨密度相关。【结论】本研究人群中 VDR 基因型尚不能作为预测骨质疏松发生的危险性指标。

关键词: 胆骨化醇; 多态现象(遗传学); 骨质疏松; 骨面密度

中图分类号: R587.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)01-0047-03

The Association Between Vitamin D Receptor Gene Polymorphism and Osteoporosis LIANG Wei, XIU Ling-ling, LIANG Yi-quan, YU Bin-jie. (Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

Abstract 【Objective】To investigate the distribution of VDR genotypes among the Hans of Guangzhou and analyze the correlation between VDR gene polymorphism and osteoporosis. 【Methods】VDR genotypes were determined by polymerase chain-reaction and restrictive fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The distribution of VDR genotypes was analyzed among the Hans of Guangzhou. 【Results】There were racial differences in the distribution of VDR genotypes and the prevalence of 'B, A, t' alleles was very low among the Hans in Guangzhou. Compared individuals with 'a' allele, those with 'A' allele had higher bone mineral density at femur among postmenopausal Han women with primary osteoporosis and osteoporosis associated with type 2 diabetes. 【Conclusion】In the Hans of Guangzhou, The polymorphism of VDR gene can not be used to predict the risk of osteoporosis.

Key words: cholecalciferol; polymorphism(genetics); osteoporosis; bone surface density

影响骨转换和骨密度的遗传因素在骨质疏松症的发生中起着重要的作用。Morrison 于 1994 年发现维生素 D 受体(VDR)基因多态性与骨密度相关, 进而可预测骨(面)密度^[1,2], 但在不同地区不同人群的研究结果并未取得一致的结论。随着糖尿病患者绝经后或年龄的增加合并骨质疏松症的亦越多, 这类患者的骨密度是否也受着遗传因素的影响? 本研究旨在了解, 广州地区汉族人群中维生素 D 受体基因多态性与原发性骨质疏松和 2 型糖尿病并骨质疏松的关系。

1 材料和方法

1.1 研究对象

原发性骨质疏松组: 从我院门诊及住院病人中随机抽取已确诊为骨质疏松症患者 30 例, 均为绝经后妇女(绝经时间半年以上), 平均年龄(66.8 ± 5.5)岁; 2 型糖尿病并骨质疏松组: 随机抽取已确诊为 2 型糖尿病合并骨质疏松的绝经后妇女 46 例(绝经时间半年以上), 平均年龄(63.7 ± 8.6)岁, 糖

尿病的诊断标准按 1985 年 WHO 的诊断; 峰值骨量组: 本院健康职工 30 名, 平均年龄(28.0 ± 4.4)岁, 男性 5 例, 女性 25 例。以上 3 组人群均为无亲缘关系的汉族人。

1.2 试剂

Taq 酶(加拿大真达公司), 限制性内切酶 Bsm I (NEB 公司)、Apa I (Promega 公司)和 Taq I (Boehringer Mannheim 公司)。引物 1: 5'-AACCAAGACTGCAAGTACCGCGTCAGTGA-3'; 引物 2: 5'-AACCAGCGGGAAGAGGTCAAGGG-3' (含 Bsm I 识别位点的引物参考文献^[1], Gibco 公司合成); 引物 3: 5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAA-3'; 引物 4: 5'-GCAACTGGTTCATGGCTGGTCTC-3' (含 Apa I 和 Taq I 识别位点的引物参考文献^[3], 上海细胞生物研究所合成)。

1.3 VDR 基因型的检测

从外周静脉血白细胞中用苯酚和氯仿法抽提基因组 DNA, 利用特定的引物对包含多态性位点的 DNA 片段进行扩增。PCR 扩增条件: 98 °C 10

min 预变性, 循环条件为 94 °C 变性 60 s, 65 °C 复性 50 s (*Bsm* I), 63 °C 复性 50 s (*Apa* I 和 *Taq* I), 72 °C 延伸 120 s, 共 32 次, 72 °C 再延伸 10 min. PCR 产物分别用限制性内切酶 *Apa* I、*Bsm* I 和 *Taq* I 消化, 消化后的产物进行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后紫外灯下观察结果, 确定 VDR 基因型。

1.4 骨矿质面密度 (bone mineral surface density, BMSD) 测定

用 QDR-2000 双能 X 线吸收仪 (DEXA) 测定腰椎侧位及右侧髋关节的骨矿质面密度。

1.5 统计分析

正态分布的变量用均数 ± 标准差表示, 偏态分布的变量用中位数及四分位间距表示, 等位基因检出率采用直接计数法, 正态分布的计量资料的组间比较用方差分析, 偏态分布的计量资料用非参数检

验, 组间基因型分布的比较用 Fisher 精确概率法检验, 检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 VDR 基因型的确定

DNA 片段上存在可被限制性内切酶 *Bsm* I、*Apa* I 和 *Taq* I 识别的多态位点, 用小写字母表示 (b, a, t), 不存在被限制性内切酶识别的位点, 用大写字母表示 (B, A, T)。

2.2 VDR 基因多态性的分布

VDR 基因型在各组中的分布均未偏离 Hardy-Weinberg 定律 ($P > 0.05$)。3 种酶定义的 VDR 基因型的分布在原发性骨质疏松组、2 型糖尿病并骨质疏松组和峰值骨量组之间差异不显著, 结果见表 1。

2.3 VDR 基因多态性与骨矿质面密度的关系

表 1 广州地区汉族人群中 VDR 基因型的分布

Table 1 The distribution of VDR genotypes in the Hans of Guangzhou

Group	<i>Bsm</i> I			<i>Apa</i> I			<i>Taq</i> I		
	bb	Bb	BB	aa	Aa	AA	tt	Tt	TT
Peak BMSD	30	0	0	27	2	1	29	1	0
Primary osteoporosis	28	1	1	20	6	4	27	2	1
Osteoporosis associated with type 2 diabetes	44	3	0	35	9	2	42	4	0

在 VDR 基因型中, 由于 'B' 和 't' 等位基因的频率较低, 故仅对 *Apa* I 定义的 VDR 基因型进行了比较。因 AA 型和 Aa 型的例数较少, 将两组 (AA 和 Aa 型) 合并后与 aa 型比较。与 AA 型和 Aa 型相比, aa 型在腰椎及股骨均有较低的骨矿质面密度, 在 2 型糖尿病并骨质疏松组中经校正了年龄、糖尿病病程、绝经状态及 BMI 等影响因素后在股骨大转子 ($F=5.682, P=0.028$) 及 Ward's 区 ($F=7.483, P=0.008$) 两个部位差异有显著性, 结果见图 1。在原发性骨质疏松组校正了年龄、BMI、绝经状态后此差异在股骨转子间区有统计意义 ($F=5.168, P=0.032$), 而在峰值骨量组中基因型间的骨矿质面密度差异不显著。

3 讨论

3.1 有关 VDR 基因的分布

广州地区汉族峰值骨量组中的 'B'、'A'、't' 3

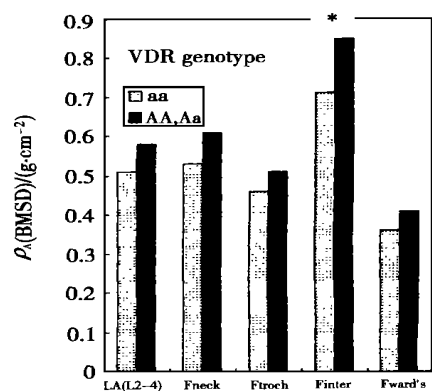


图 1 2 型糖尿病并骨质疏松组中 VDR 基因型间骨矿质面密度

Fig. 1 Bone mineral surface density (BMSD) among VDR genotypes in osteoporosis associated with diabetes

LA (L2-4); lateral spine (L2-4), Fneck; femoral neck, Ftroch; femoral trochanter, Finter; femoral intertrochanter, Fward's; femoral Ward's. *: statistical significance

种等位基因频率分别为 0.667% 和 1.67%, 与 Morrison 等^[3]的研究结果明显不同。赵金秀等在北京地区 96 例骨矿质面密度处于峰值的健康汉族人群中的研究表明 VDR 基因型分布以 bb 型为主, 与本研究结果相同 ($P > 0.05$)^[4]。Bsm I 定义的 VDR 基因型在我国峰值骨量的汉族人群中的分布与朝鲜人相似 ($P > 0.05$)^[5], 虽与日本人有些差别 ($P < 0.05$)^[6], 但明显不同于欧美国家的 ($P < 0.01$)^[1,3,7]。美国、澳大利亚等国家大多数为高加索人, 而韩国、日本、中国等同属蒙古人种。亚洲人群中 VDR 基因型以 bb 型最多见, 其次为 Bb 型, BB 型较少; 而高加索人群中则以 Bb 型为主, 其次为 bb 型, BB 型亦不少, 说明 VDR 基因多态性分布存在着明显的种族差异。Morrison 等^[1]认为这一多态性的产生是机体对自然环境的适应, 经过长期自然选择而形成的, 因此在不同人种及地理环境间存在着差别, 这与骨质疏松症的发病率存在着种族差异是一致的。

3.2 VDR 基因多态性与骨矿质面密度

与 Morrison 等^[2]的结果不同, 本研究在绝经后妇女原发性骨质疏松症组及 2 型糖尿病并骨质疏松组中 'a' 等位基因与低骨密度相关。而北京地区 44 例原发性骨质疏松症绝经后妇女的研究显示 Aa(Bb)型的骨密度较 aa(bb)型的高, 与本结果相似^[4]。虽然在峰值骨量组中未发现这种联系, 可能与 AA 和 Aa 型例数较少有关, 还须进一步大样本的研究证实。Uitterlinden 等^[7]用 PCR-RFLPs 技术确定 VDR 基因型, VDR 基因多态性与骨密度的关系较弱, 而用 PCR 直接测序的技术检测 Bsm I、Taq I 和 Apa I 的单倍型, VDR 基因型与骨密度有较强的相关性, 与本研究结果相似, 'B'、'A' 和 't' 等位基因与高骨矿质面密度相关。这些研究提示 VDR 基因的多态位点可能与另一个影响骨矿质面密度的基因之间存在着不平衡连锁, 而这一连锁关系因人种不同而有差异; 或者 VDR 基因多态性确实与骨矿质面密度相关, 但现有的检测位点并未真正代表与发病相关的多态性位点。

3.3 VDR 基因多态性影响骨矿质面密度和骨转

换的机制

VDR 基因在 3' 端非翻译区的多态性可能影响了该基因的转录活性和 mRNA 的稳定性^[1], 使 VDR 质和量发生了微小的改变。骨吸收和骨形成受许多因素的调控, 当生理和/或病理情况下, VDR 的数目及功能更依赖于其编码基因的特性时, VDR 基因多态性所引起的微小差异被放大, 从而影响骨矿质面密度^[8]。骨质疏松作为一种复杂病, 受多个基因的调控, 基因组上数个基因的易感基因组合构成了该病的遗传易感性, 而群体中具有遗传易感性的高危人群的发病与否及程度又受环境因素的调控。因此对可能影响骨量和骨结构的基因进行大样本和多种族间的调查研究, 并进一步探讨候选基因的 DNA 序列与功能的关系, 将有助于从分子水平阐明基因影响骨代谢和骨密度的机理。

参考文献:

- [1] Morrison N A, Yeoman R, Kelly P J, *et al.* Contribution of transacting factor alleles to normal physiological variability, vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(15): 6665.
- [2] Morrison N A, Qi J C, Tokita A, *et al.* Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles [J]. *Nature*, 1994, 367 (6460): 284.
- [3] Riggs B L, Nguyen T V, Melton L J, *et al.* The contribution of vitamin D receptor gene alleles to the determination of bone mineral density in normal and osteoporotic women [J]. *J Bone Miner Res* 1995, 10(6): 991.
- [4] 赵金秀, 周学瀛, 刘国仰, 等. 北京地区汉族人维生素 D 受体基因多态性分布 [J]. *中国医学科学院学报*, 1997, 19(1): 18.
- [5] Lim K S, Park Y S, Park J M, *et al.* Lack of association between vitamin D receptor genotypes and osteoporosis in Koreans [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995, 80(12): 3677.
- [6] Yamagata Z, Miyamura T, Lijima S, *et al.* Vitamin D receptor gene polymorphism and bone density in healthy Japanese women [J]. *Lancet*, 1994, 344(8928): 1027.
- [7] Uitterlinden A G, Pols H A, Burger H, *et al.* A large-scale population-based study of the association of vitamin D receptor gene polymorphisms with bone mineral density [J]. *J Bone Miner Res* 1996, 11(9): 1241.
- [8] Farrow S. Allelic variation and the vitamin D receptor [J]. *Lancet*, 1994, 343(5): 1242.

(编辑 黄小延, 张敬瑞)