

维生素 D 受体基因型多态性与绝经前后妇女的骨密度

张清学¹, 王文军¹, 邝健全¹, 申欢莲³, 黄宏兴³, 蒋宁一²

(中山医科大学孙逸仙纪念医院 1. 妇产科; 2. 核医学科, 广东 广州 510120; 3. 广州中医药大学附属骨伤科医院)

摘要: 【目的】观察维生素 D 受体(VDR)基因型与女性峰值骨密度以及绝经后骨质疏松的关系。【方法】收集 184 例妇女, 其中绝经后无骨折妇女 78 例、绝经后有脆性骨折的病人 34 例、围绝经期妇女 20 例和年轻健康妇女 52 例, 用双能 X 线吸收骨密度仪(DEXA)测量其骨密度, 聚合酶链反应-限制性片段长度多态(PCR-RFLP)的方法来分析维生素 D 受体基因型。【结果】184 例妇女中, 基因型 BB、Bb 和 bb 所占比例分别为 7.6%(14/184)、45.1%(83/184)和 47.2%(87/184); 年轻健康妇女各基因型的峰值骨密度无明显差别, 绝经后妇女各基因型的骨密度和骨质疏松的百分比也无明显差异。【结论】维生素 D 受体基因型与女性峰值骨密度和绝经后骨质疏松无明显联系。

关键词: 受体, 骨化血醇/遗传学; 多态性, 限制性片段长度; 骨质疏松, 绝经后; 骨密度

中图分类号: R681.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)05-0376-04

Relationship between the Polymorphism of Vitamin D Receptor Gene and Bone Mineral Density in Pre- and Postmenopausal women

ZHANG Qing-xue¹, WANG Wen-jun¹, KUANG Jian-quan¹,
SHEN Huan-lian³, HUANG Hong-xing³, JIANG Ning-yi²

(1. Department of Obstetrics & Gynecology; 2. Department of nuclear medicine of Memorial Hospital, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences Guangzhou 510120, China; 3. Orthopedic Hospital Affiliated to the University of Chinese Traditional Medicine of Guangzhou 510260, China)

Abstract: 【Objective】To observe the relationship between Vitamin D receptor (VDR) genotype and bone mineral density in pre- and postmenopausal women. 【Methods】Seventy-eight postmenopausal women without fragile fractures, 34 postmenopausal women with fragile fractures, 20 peri-menopausal women with climacteric symptoms and 52 healthy young women (aged 25~35 years) were enrolled the study. Bone mineral density was measured by dual energy X-ray absorptiometry (DEXA) at lumbar spine, proximal femur, forearm and total body. We also examined the restriction fragment length polymorphism of the polymerase chain reaction product (PCR-RFLPs) of the VDR gene with BsmI enzyme (B, absence, b, presence of cut site) in these women. 【Result】In 184 women, the distribution of BsmI RFLPs was as follow: BB, 14(7.6%); Bb, 83(45.1%); bb, 96(47.2%); respectively. The bone mineral density in healthy young women was not significantly different among the three genotypes groups. The bone mineral density in postmenopausal women and the ratio of postmenopausal osteoporosis were also not significantly different among the three genotypes groups. 【Conclusion】These data indicated no significant effects of the VDR genotypes defined by BsmI on female peak bone mineral density and postmenopausal osteoporosis.

Key words: receptor calcitriol/genetics; polymorphism, restriction fragment length; osteoporosis postmenopause; bone density

收稿日期: 1999-09-20

基金项目: 广东省卫生厅“五个一科教兴医工程”重点项目(编号 E000096092)和中山医科大学科研基金资助(B000097124)

作者简介: 张清学(1964-)男, 河南开封人, 博士, 副教授

有关遗传因素在绝经后骨质疏松发病中的作用,近年来引起了不少学者的关注,1994年澳大利亚学者 Morrison 等^[1]首次报道维生素D受体(VDR)基因型与绝经后骨质疏松有相关性,B型基因者比b型基因者在绝经后更多更早地发生骨质疏松。而国内的报道还不多,尤其是广州地区的情况?我们对此进行初步探讨,总结如下。

1 材料和方法

1.1 研究对象

在1997年2月~1999年3月,收集在广州居住10年以上的汉族妇女184名,其中绝经1年以上无骨折妇女78例,绝经1年以上有脆性骨折(非暴力引起)妇女34例,40岁以上停经1年以内有绝经期症状的围绝经期妇女20例,25~35岁年轻健康妇女52例,详细询问病史及全身体检,检查其血、尿常规和肝、肾功能,排除影响骨代谢的慢性病或药物。

1.2 VDR 基因片段扩增和分型

1.2.1 DNA 提取 按常规酚/氯仿法提取白细胞基因组DNA;

1.2.2 引物 根据参考文献^[2]由真达公司合成,引物1:5'-CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTC-AGTGA-3';引物2:5'-AACCAGCGGAAGAGGT-CAAGGG-3'。

1.2.3 聚合酶链反应 10xBuffer 3 μ L、dNTP(2 mmol/L)3 μ L、引物₁ 3 μ L、引物₂ 3 μ L、DNA 模板 3~6 μ L、去离子水 12~15 μ L(至终体积为 30 μ L),将上述试剂混匀,加入灭菌石蜡油 50 μ L 覆盖液面以防蒸发,离心后置于PCR仪(美国 PERKIN ELMER Gene Amp PCR System 9600),于95 $^{\circ}$ C变性5 min后加入耐热 Taq DNA 合成酶(Promega 公司产品)2U,按优化条件进行扩增35个周期,用1.2g/L琼脂糖凝胶电泳,鉴定有无1850 bp的扩增产物。

1.2.4 限制性内切酶 BsmI 进行酶切鉴定分型 灭菌去离子水 7.5 μ L、10Xbuffer 2 μ L、限制性内切酶 Bsm I (New England BioLabs 公司产品)1.5 U、VDR-PCR 产物 10 μ L,混匀,加入无菌石蜡油 25 μ L,离心,65 $^{\circ}$ C 孵育 16 h,用 1.5 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定(见图1),VDR-PCR 扩增产物片段长度为1850 bp,B型基因不含 Bsm I 切点,b型基因

含 Bsm I 切点被切为1200 bp 和 650 bp 两个片段。用 1.5 g/L 琼脂糖凝胶电泳,纯合子 BB 型只有 1850 bp 一条电泳带;纯合子 bb 型有 650 bp 和 1200 bp 两条电泳带;杂合子 Bb 型有 1850 bp、1200 bp 和 650 bp 3 条电泳带。

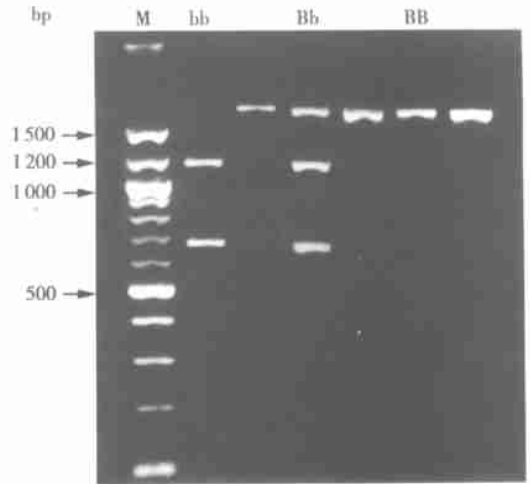


图1 VDR-PCR 产物经 BsmI 酶切后电泳图

Fig 1 Genotypes of VDR

1.3 骨密度测量

用 HoLogic QDR4500W 型双能 X 线骨密度仪测量骨密度,除去身上的金属器物,于平仰卧位进行全身骨扫描、第1~4腰椎正位骨扫描和非优势手尺、桡骨中远 1/3 处及超远端骨扫描,左下肢屈膝位扫描左髌部(股骨颈、大转子、Ward 区),微机自动分析及打印结果。每日测量腰椎体模,该仪器的长期变异系数为 0.36%。

1.4 统计学方法

计量资料以均数±标准差表示以及 t 检验或方差分析,计数资料用 χ^2 分析, $P < 0.05$ 有统计学意义,用 SPSS 7.0 for Windows 软件处理分析。

2 结果

2.1 不同基因型妇女的一般情况

112 例绝经后妇女的年龄、初潮年龄、绝经后年限、孕产次、身高、体质量和体质量指数情况,各基因型之间比较,无明显差别($P > 0.05$);52 例年轻健康妇女的各项指标,也无明显差别,见表 1, ($P > 0.05$)。

2.2 VDR 基因型在各组中的分布

在 184 例妇女中,VDR 基因型 BB、Bb、bb 所占

表 1 各基因型的一般资料

Table 1 General condition of different genotypes

Genotype	Postmenopausal women (n = 112)			Healthy young women (n = 52)		
	BB (n = 9)	Bb (n = 51)	bb (n = 52)	BB (n = 4)	Bb (n = 23)	bb (n = 25)
Age(y)	66.6±4.9	65.9±10.1	67.6±10.5	28.6±3.8	29.7±3.3	28.2±3.3
Age of menarche(y)	13.6±2.3	14.1±1.5	13.9±1.8	14.1±1.3	13.8±1.7	13.7±1.4
Duration of postmenopause(y)	20.6±13.2	15.9±9.8	19.1±10.8			
Times of Gestations	4.3±2.3	3.6±1.9	4.7±2.3	1.2±0.5	1.6±1.1	1.0±0.9
Parities	3.0±1.3	2.7±1.5	2.9±1.4	0.6±0.5	0.9±0.3	0.5±0.6
Height(cm)	154.7±6.1	152.3±5.9	153.9±7.1	157.4±2.1	158.3±3.8	155.8±4.3
Weight(kg)	55.6±6.2	54.1±9.7	53.8±8.6	50.6±5.7	50.9±4.9	51.6±6.2
Index of body mass	23.2±2.1	23.5±3.7	22.5±3.7	20.3±2.5	20.3±1.8	21.1±1.8

表 2 VDR 基因型在各组中的分布

Table 2 Distribution of the VDR genotypes in different groups

n (%)

Genotype	Postmenopausal women	Postmenopausal women	Perimenopausal	Healthy young	Total
	without fractures (n = 78)	with fractures (n = 34)	women (n = 20)	women (n = 52)	
BB	7(9)	2(6)	1(5)	4(8)	14(8)
Bb	36(46)	15(44)	9(45)	23(44)	83(45)
bb	35(45)	17(50)	10(50)	25(48)	87(47)

比例分别为 7.6% (14/184)、45.1% (83/184) 和 47.2% (87/184), 见表 2, 行卡方检验, $P > 0.05$, 各组间无明显差异。

2.3 绝经后妇女 3 种 VDR 基因型中患有骨质疏松的例数

骨密度低于同性别峰值骨密度的 2 个标准差以上, 即诊断为骨质疏松, 3 种 VDR 基因型在不同部位骨质疏松中的构成比见表 3, 行卡方检验, P 值均大于 0.05。

表 3 绝经后妇女 3 种 VDR 基因型中骨质疏松的例数

Table 3 Incidence of postmenopausal osteoporosis in the 3 VDR genotypes n (%)

Genotype	Total body	Lumbar	Hip	Forearm
BB (n = 9)	6(66.7)	5(55.6)	3(33.3)	2(22.2)
Bb (n = 51)	33(64.7)	35(68.6)	14(27.5)	16(31.4)
bb (n = 52)	38(73.1)	36(69.2)	14(26.9)	16(30.8)
Total (n = 112)	77(66.8)	76(67.9)	31(27.8)	34(30.4)

2.4 3 种 VDR 基因型的骨密度

因为年轻健康妇女与绝经后妇女的骨密度有明显差别, 将其分别进行统计学处理。在 112 例绝

经后妇女(包括无骨折和骨折者)中, 各基因型的平均骨密度值结果见表 4。行方差分析, 各种基因型的平均骨密度值比较无明显差异, $P > 0.05$; 在 52 例年轻健康妇女中, 各基因型的平均骨密度值结果亦见表 4, 行方差分析, 各种基因型的平均骨密度值比较无明显差异, $P > 0.05$ 。

3 讨论

在绝经后骨质疏松发病因素中, 遗传因素的作用已得到肯定^[3]。在遗传因素中, VDR 基因是与骨钙代谢密切相关的基因之一, 该基因位于第 12 号染色体上^[4]。1994 年 Morrison 等用限制性片段长度多态(RFLP)进行分析, 发现维生素 D 受体基因型与骨代谢和绝经后骨质疏松密切相关, 具有 B 型基因者比 b 型基因者, 在绝经后更多、更早地发生严重骨质疏松和骨折。尔后, 又有其他学者对此进行研究, 但结果有很大出入: 如赵金秀^[5]等研究观察 106 例绝经后妇女, 发现 Bb 型基因者比 bb 型者骨密度低; 韩国学者 Sung 等^[2]报道, BB、Bb、bb 分别占 1.4%、12.9% 和 85.7%, VDR 基因型与骨密度无关, 25 例严重骨质疏松的病人中, 无 1 例是

BB型基因;美国学者 Looney^[6] 也发现 BB型并不能预测严重的骨质疏松,2个骨密度很低的严重骨

表4 年轻健康妇女和绝经后妇女3种VDR基因型的平均骨密度值

Table 4 Mean bone mineral density of healthy young women or postmenopausal women in different VDR genotypes (g/cm^2)

	Total	Lumbar	Hip	Forearm
Young health women				
BB(n = 4)	1.037±0.101	0.949±0.995	0.880±0.094	0.523±0.035
Bb(n = 20)	1.119±0.098	0.990±0.117	0.902±0.123	0.579±0.028
bb(n = 28)	1.058±0.072	0.962±0.096	0.881±0.097	0.553±0.037
Postmenopausal women				
BB(n = 11)	0.911±0.083	0.787±0.119	0.755±0.105	0.475±0.088
Bb(n = 59)	0.909±0.101	0.744±0.125	0.694±0.116	0.446±0.097
bb(n = 42)	0.898±0.091	0.753±0.122	0.675±0.108	0.433±0.101

质疏松的病人是 bb型基因,而2例骨密度最高者是 BB型基因;1996年 Beavan等^[7]观察到 BB、Bb、bb型在英国人群中所占的比例分别是15.4%、47.4%和37.2%,在中国沈阳则分别是0%、14.7%和85.3%,在冈比亚分别是3.3%、14.8%和76.1%,这说明VDR基因型的多态性分布在不同地域和不同人种中具有明显的差异。在我们观察的184名病人中, BB、Bb、bb型基因所占比例分别为7.6%、45.1%和47.2%,与日本学者^[8]的结果(6.9%、38.2%、和54.9%)相近。综合日本以及韩国和本文结果的资料可以看出,亚洲人种的VDR基因型与其他人种明显不同, B型基因的出现频率比在欧美国家白色人种中的出现频率为低。在年轻健康妇女中,3种基因型的骨密度无明显差异,说明VDR基因型对峰值骨密度没有明显影响;在绝经后妇女中,3种基因型的平均骨密度值没有明显差别,说明VDR基因型对绝经后的骨密度也无明显作用,同时,在3种基因型的绝经后妇女中骨质疏松和骨折的发生率也没有明显差别,因此,就不能只根据VDR基因型来预测或者判断绝经后骨质疏松和骨折的发生。至于如何解释我们的结果与当初 Morrison等的结果的差异呢?我们考虑,可能是由于我们收集的病例与其观察的病例在遗传学上有很大差异,因而得出不同的结论;同时,影响骨代谢的因素有很多,诸如绝经、年龄、孕产次、体质量、营养状况、生活习惯、疾病等,这些影响因素对绝经后骨质疏松的发生比VDR基因型可能起更重要的作用,而单独考虑VDR基因型的作用时,即使有影响可能也很小,因VDR基因型并不起

决定作用。

参考文献:

- [1] Morrison N A, Jian C Q, Akifumi T, *et al.* Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles[J]. *Nature*, 1994, 367(20): 284.
- [2] Sung K L, Young S P, Jae M P, *et al.* Lack of association between vitamin D receptor genotypes and osteoporosis in Korean[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995, 80(12): 3677.
- [3] Nichoias A P, John A E, John A H, *et al.* Genetic determinants of bone mass in adults[J]. *J Clin Invest* 1987, 80(3): 706.
- [4] Juliette H F, Nigel A M, Andrew B, *et al.* Apal dimorphism at the human vitamin D receptor gene Locus[J]. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(5): 2150.
- [5] 赵金秀,周学瀛,孟迅吾,等.中国妇女维生素D受体基因型与骨密度及骨钙素关系的研究[J].*中国医学科学院学报*, 1997, 19(4): 252.
- [6] Looney J E, Yoon H K, Fischer M, *et al.* Lack of a high prevalence of the BB vitamin D receptor genotype in severely osteoporotic women[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1985, 80(7): 2185.
- [7] Beavan S, Prentice A, Yan L, *et al.* Difference in vitamin D receptor genotype and geographical variation in osteoporosis[J]. *The Lancet*, 1996, 348(13): 136.
- [8] Yamagata Z, Miyamura T, Iijima S, *et al.* Vitamin D receptor gene polymorphism and bone mineral density in health Japanese women[J]. *The Lancet*, 1994, 344(8): 1027.

(编辑 关淡庄)