

绝经后健康妇女雌激素受体基因多态性与骨密度关系的研究

黄琪仁 王钦红 张良平 周琦 陆敬辉 刘玉娟 何进卫 林发雄



目的 从分子生物学水平探讨中国绝经后健康妇女雌激素受体(ER)基因多态性与骨密度的关系。**方法** 选择绝经后健康、无亲缘关系妇女 237 例,运用双能 X 线吸收骨密度仪及聚合酶链反应——限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法分析 ER 基因多态性与骨密度的关系。**结果** 237 例绝经后健康妇女中 PP、P_p 及 pp 基因型频率分别为 0.198、0.443 及 0.359;P 与 p 等位基因频率分别为 0.4198、0.5802。方差分析(ANOVA)显示股骨大转子部位骨密度与 ER 基因多态性相关($p=0.0106$),PP 基因型各部位骨密度值均低于 P_p、pp 基因型。逐步多元回归分析发现 ER 基因多态性与股骨大转子($p=0.0548$)及腰椎 2-4($P=0.0998$)部位的骨密度相关。**结论** 中国绝经后健康妇女 ER 基因多态性与股骨大转子部位的骨密度显著相关,p 等位基因具有一定的骨量保护作用,提示从分子水平探讨骨量丢失规律以及防治骨质疏松症的发生发展具有一定的现实意义。

关键词 雌激素受体基因 骨密度 绝经后健康妇女 多态性

Relationship between bone mineral density and polymorphism of the estrogen receptor gene in postmenopausal health women

Huang Qiren, Wang Qinrong, Zhang Liangping et al.

Abstract 237 health, unrelated postmenopausal women who had been in Shanghai for more than ten years were selected. Bone mineral density(BMD) was determined by dual energy X-ray absorptiometry (DEXA) and the polymorphism of estrogen receptor (ER) gene was detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. Our results showed that the distribution of the genotype in the ER gene was as follows: PP 0.198, P_p 0.443 and pp 0.359 respectively. ANOVA analysis indicated that the BMD of trochanter major (Troch) was associated with the polymorphism of ER gene ($P=0.0106$). Multiple stepwise regression analysis showed that there was correlation between the polymorphism of ER gene and BMD of Troch ($P=0.0548$), as well as BMD L₂-L₄ ($P=0.0998$). Our conclusion comes to that there is significant association of polymorphism in ER gene with BMD of Troch in health postmenopausal Chinese women. P allele maybe a protective factor to bone mass loss.

本课题为卫生部国际交流中心默沙东科研基础资助

作者单位:上海市第六人民医院骨质疏松防治中心(黄琪仁 王钦红 周琦 陆敬辉 刘玉娟 林发雄);上海市第六人民医院胸外科实验室(张良平 何进卫)

作者简介:黄琪仁,女,1938 年生。1962 年中国协和医科大学毕业后,曾在该校病理生理教研室任教。现为上海市第六人民医院内分泌代谢专业主任医师、教授。任上海市第六人民医院副院长、上海第二医科大学市六临床医学院副院长,市六医院骨质疏松防治中心及骨代谢实验室主任。为上海市医学会及上海市老年学会骨质疏松专业委员会副主任委员,中央卫生部老年卫生工作领导小组骨质疏松专业组委员。

家族和孪生子的研究表明,骨密度不同程度地受到遗传因素的调控。1994年 Morrison 等指出,维生素 D 受体(Vitamin D receptor, VDR)基因多态性与骨密度相关^[1]。嗣后,国外许多学者致力于探讨骨质疏松症的分子发病机制,发现尚有几种候选基因可能涉及到这个过程^[2],例如雌激素受体(estrogen receptor, ER)基因、白介素-6(interlukin-6, IL-6)基因、转化生长因子(transforming growth factor, TGF)基因等。Smith 等^[3]在一例 ER 基因突变病人中证实,该受体直接影响骨密度的改变。因此我们率先在国内运用 PCR-RFLP 分析方法研究绝经后健康妇女 ER 基因多态性与骨密度的关系,现将结果报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象 选自长期居住上海市区(10年以上)的 10 个居民点及本院骨质疏松门诊的绝经后、健康、无亲缘关系的汉族妇女 267 例,年龄 47~74 岁(平均年龄 60.7 ± 5.44 岁),绝经年限大于 1 年,所有对象均进行严格的健康调查表填写、实验室常规检查(血钙、磷、碱性磷酸酶、甲状旁腺激素、血糖、肝、肾功能)及腰椎 X 线侧位片,以排除患有各种影响骨代谢疾病及服用过影响骨代谢的药物者。筛选后,剔除 30 名,其中绝经小于 1 年者 2 人,过早绝经(<40 岁)者 1 人,子宫卵巢切除者 4 人,血糖高于 7mmol/L 者 8 人,有甲亢史者 2 人,类风湿史 4 人,血液疾病史 2 人,服用过尼尔雌醇片 2 人,腰椎压缩性骨折 1 人,骨密度异常升高 1 人,体重指数大于 33 者 3 人(为本仪器测试功能所限)。故入选本研究者共 237 例。

1.2 方法

骨密度测定:应用双能 X 线吸收骨密度仪(HOLOGIC, QDR2000 型)。测定部位为腰椎 $L_2 \sim L_4$ (L_{2-4}),髋部各部位分别为:股骨颈(Neck)、大转子(Troch)、粗隆间(Inter)、股骨上端(总, Total)、华氏三角区(Ward's)。

雌激素受体等位基因测定:(1)DNA 抽取;

外周血白细胞常规蛋白酶消化,酚、氯仿抽取基因组 DNA。(2)PCR 反应与酶切:

引物序列:上游引物 5'CTGCCACCC-TATCTGTATCTTTTCCTATTCTCC3'

下游引物 5'TCTTTCTCTGCCACCCT-GGCGTCGATTATCTGA3'

PCR 反应条件:基因组 DNA 0.5~1 μ g, 0.1 μ m ER 引物, 0.8mM dNTP, 1.75mM Mg^{2+} , 2u Taq DNA 聚合酶和相应的反应缓冲液,总体积为 60 μ l。热循环条件:预变性 95℃ 4 分钟;变性 94℃ 30 秒;退火 58℃ 30 秒;延伸 72℃ 45 秒, 30 个循环;最后 72℃ 保温延伸 4 分钟。酶切反应:PCR 产物 15 μ l, 加 Pvu I (Boehringer 公司) 0.6 μ l (10u/ μ l), 37℃ 2h 保温酶切。酶切产物经 1.5% 琼脂糖(上海华美公司)凝胶电泳后,宝丽来一次性成像仪摄片。存在 Pvu I 限制性内切酶位点以“p”表示,不存在则以“P”表示。

统计分析:组间方差分析(ANOVA)采用 SAS 统计软件,运用 Fisher 氏保护性最小重大差别法(PLSD);多因素分析采用逐步多元回归法(Multiple stepwise regressiom);剔除标准为 $P > 0.10$ 。

2 结果

2.1 237 例绝经后健康妇女不同基因型组的一般临床资料,见表 1。

表 1 237 例绝经后健康妇女不同基因型组的一般资料比较

指 标	PP (n=47)	Pp (n=105)	pp (n=85)
年龄(岁)	60.47 $\pm$ 4.70	61.14 $\pm$ 5.78	60.40 $\pm$ 5.84
绝经年限(年)	10.91 $\pm$ 4.75	11.98 $\pm$ 6.79	11.05 $\pm$ 6.40
体重(kg)	56.24 $\pm$ 8.24	58.14 $\pm$ 7.65	58.78 $\pm$ 8.73
身高(cm)	153.12 $\pm$ 5.38	154.47 $\pm$ 5.32	154.70 $\pm$ 4.91
BMI(kg/m ²)	23.95 $\pm$ 3.10	24.35 $\pm$ 2.90	24.57 $\pm$ 3.57

注:237 例绝经后健康妇女三组间在年龄、绝经年限、体重、身高、BMI 基本相似

2.2 ER 基因型及等位基因频率的分布比较

(1)ER 基因 Puv II 内切酶位点多态性确定为:PP 型可见单一条带 1.3kb;P_p 型可见 1.3kb、0.45kb、0.85kb 三条带;pp 型可见 0.45kb、0.85kb 二条带。见图 2。ER 基因型、等位基因频率分布见表 2。

表 2 绝经后健康妇女 ER 基因型、等位基因频率分布

基因型	例数	频率	等位基因	染色体数	频率
PP	47	0.198	P	199	0.4198
P _p	105	0.443	p	275	0.5802
pp	85	0.359			

基因型分布符合 Hardy-Wenbergl 氏平衡($\chi^2=1.94, 0.1 < P < 0.25$)

(2)与 Kobayashi^[4]和 Han^[5]报道的日本、韩国绝经后健康妇女 ER 基因多态性频率比较见表 3。

表 3 与日本、韩国绝经后健康妇女 ER 基因多态性频率比较

基因型 (Puv II)	中国人 (n=237)	日本 (n=238)	韩国 (n=248)
PP	0.198	0.194	0.141
P _p	0.443	0.513	0.548
pp	0.359	0.294	0.311

表 3 所见亚洲黄种人群中绝经后健康妇女其 ER 基因 Puv I 位点多态性分布频率基本相似。

(3)ER 基因多态性与骨密度的关系:三种基因型(PP、P_p、pp)与骨密度的关系见表 4 及图 1。P 值为三种基因型组间方差分析(ANOVA)的结果。

表 4 绝经后健康妇女 ER 基因多态性与骨密度的关系($\bar{x} \pm s$)

检测部位	PP (n=47)	P _p (n=105)	pp (n=85)	P 值
腰椎 2-4	0.769 $\pm$ 0.109	0.804 $\pm$ 0.123	0.819 $\pm$ 0.125	0.080
股骨颈	0.612 $\pm$ 0.080	0.646 $\pm$ 0.090	0.637 $\pm$ 0.092	0.083
大转子	0.485 $\pm$ 0.080	0.524 $\pm$ 0.077	0.524 $\pm$ 0.080	0.010*
粗隆间	0.822 $\pm$ 0.124	0.866 $\pm$ 0.130	0.868 $\pm$ 0.138	0.119
股骨上端 (总)	0.684 $\pm$ 0.099	0.721 $\pm$ 0.102	0.716 $\pm$ 0.114	0.123
华氏三角区	0.444 $\pm$ 0.101	0.472 $\pm$ 0.104	0.471 $\pm$ 0.114	0.287

* PP 型组大转子部位的骨密度与 P_p 型组及 pp 型组的骨密度有显著差异

图 1 所见,腰椎 2-4、股骨颈、大转子、粗隆间、股骨上端(总)、华氏三角区部位均显示凡带 p 等位基因者其骨密度相对较高,而 PP 型组均较 P_p 型组及 pp 型组的骨密度为低。

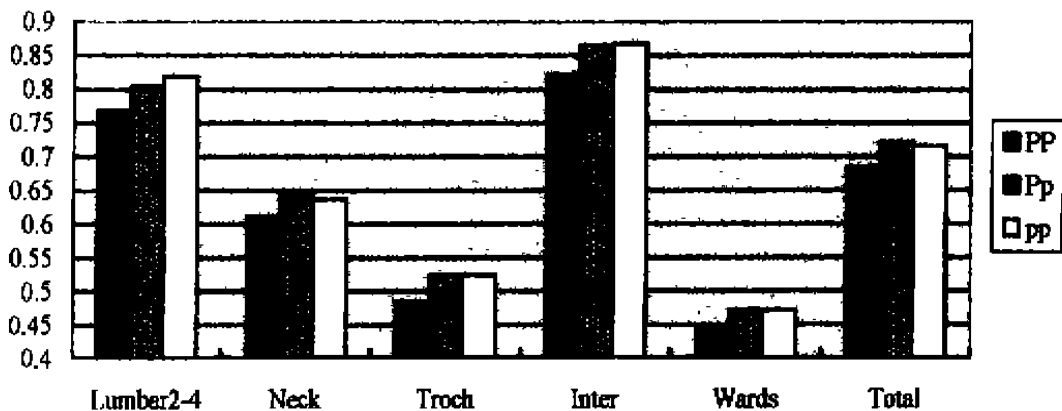


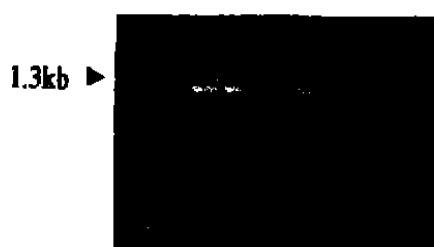
图 1 各部位各基因型组的骨密度的比较

(4)逐步多元回归法分析体重、身高、年龄、BMI、停经年限、ER 基因多态性对各部位骨密度的影响结果,发现腰椎部位骨密度与体重($P=0.0001$)、停经年限($P=0.0001$)显著相关,与 ER 基因多态性呈相关($P=0.0998$);Troch 部位骨密度与体重($P=0.0001$)、停经年限(P

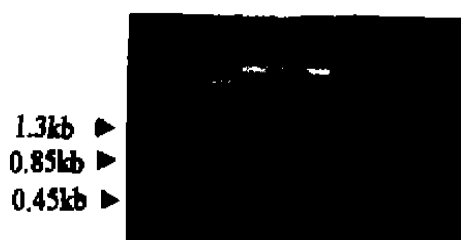
$=0.0001$)显著相关,与 ER 基因多态性有相关($P=0.0548$)。

3 讨论

骨密度是反映骨质疏松症骨量减少以及评价骨质疏松性骨折的可靠指标,受到多种因素



ER 基因 PCR 产物电泳图谱



ER 基因 PvuII 内切酶酶切产物电泳图

图2 ER 基因 Pvu II 内切酶位点多态性确定

的影响,如环境和遗传因素等。Morrison 等^[1]研究发现,维生素 D 受体(VDR)基因多态性可影响骨密度整个遗传因素的 75%。VDR 启动子受雌激素的调控,绝经后妇女骨密度变化直接与雌激素水平有关。Boden 等^[7]在小鼠实验中发现雌激素受体对骨愈合和成骨至关重要。为此,我们设想 ER 基因多态性与中国绝经后妇女的骨密度可能有一定关系。

我们率先在国内对绝经后健康妇女运用 PCR-RFLP 分析方法探讨 ER 基因多态性与骨密度之间的关系。237 例绝经后健康中国妇女中 ER 基因 PP、P_p、pp 基因型频率分别为 0.198、0.443、0.359;P 与 p 等位基因频率为 0.4198、0.5802。这与 Kobayashi^[4]和 Han 等^[5]报道的日本、韩国绝经后健康妇女的 ER 基因型和等位基因频率的结果基本相似。欧美国家的 ER 基因型及等位基因频率的分布尚未见报道。

对 ER 基因多态性和骨密度之间的关系分析发现:(1)三种基因型组间方差分析(ANOVA)显示在股骨大转子部位骨密度有显著性差异($P=0.0106$)。(2)三种基因型在各部位的骨密度变化显示纯合子 PP 型骨密度均低于 P_p 和 pp 型的, P_p 和 pp 型基本相似,这与

Kobayashi 等^[4]报道的日本绝经后健康妇女 ER 基因 PP 型骨密度低于 pp 型, P_p 型居中 ($PP < P_p < pp$)的结果基本一致。我们的结果提示 p 等位基因可能具有一定的骨量保护作用。但最近 Han 等^[5]报道 248 例韩国健康绝经后早期的妇女中 ER 基因多态性与骨密度以及对雌激素替代治疗的反应性无密切关系。

多元回归分析表明 ER 基因型与大转子、腰椎的骨密度改变有相关与大转子部位 PP 型组骨密度明显低于 P_p 型组及 pp 型组的骨密度有显著差异($P=0.010$)的结果相吻合。另外,体重和绝经年限对腰椎、大转子的骨密度有显著相关(P 均为 0.0001),与 Willing 等文献基本一致^[6]。我们的研究表明运用分子遗传方法筛选骨质疏松症高危易感人群,有可能预测某些部位的骨质疏松易感性,这为进一步进行一级干预研究奠定理论基础,并对探讨骨质疏松症的分子遗传发病机制具有一定意义。

本文研究的统计分析工作承蒙本院医学遗传研究室郑以漫博士指导,特此致谢

参 考 文 献

- 1 Morrison NA, Qi JC, Tokita A, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature*, 1994, 367:284.
- 2 Ralston SH. The genetics of osteoporosis. *Q J Med*, 1997, 90:247.
- 3 Smith EP, Boyd J, Frank GR, et al. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *New Engl J Med*, 1994, 331:1056.
- 4 Kobayashi S, Inoue S, Hosoi T, et al. Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene. *J bone mineral research*, 1996, 11:306.
- 5 Han KO, Moon IG, Kang YS, et al. Nonassociation of estrogen receptor Genotypes with bone mineral density and estrogen responsiveness to hormone replacement therapy in Korean postmenopausal women. *J Clin endocrinology and metabolism*, 1997, 82:991.
- 6 Willing MC. Determinants of bone mineral density in postmenopausal white Iowans. *J ournal Gerontology A Biology Science Medicine Science*, 1997, 52:237.
- 7 Boden SD. Estrogen receptor mRNA expression in callus during fracture healing in the rat. *Calcification tissue international*, 1989, 45:324.