

维生素 D 受体与骨质疏松症

杨帆 蔡德鸿

骨质疏松症是一种以骨量绝对减少,骨折风险增加为特征的骨代谢性疾病。近年来的研究表明基因因素在骨质疏松症的发生机制中起着重要的作用。其中有关维生素 D 受体基因的研究最为广泛。

维生素 D 是重要的骨代谢调节激素之一,其作用在于调节骨、钙的内环境稳定,涉及骨形成和骨循环、小肠钙吸收、破骨细胞功能、甲状旁腺激素(PTH)的产生、肾脏维生素 D 的激活等。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 即钙三醇,是维生素 D 的活性形式,通过与靶细胞内高度特异性的维生素 D 受体(VDR)结合而产生对钙磷代谢等多方面的调节作用。VDR 基因位于12号染色体,属于配体激活的受体超基因家族,与其他类固醇激素受体、甲状旁腺激素及视黄酸受体具有高度的同源性。已证明少数受体的突变可影响受体的功能而致病,如 VDR 基因的突变导致佝偻病、雌激素受体突变导致自发性流产等。

1 VDR 基因与骨转换的关系

骨钙素是骨基质中丰富的非胶原蛋白,由成骨细胞产生,其功能尚不清楚。骨钙素与矿化骨强力结合,但有一部分新生的骨钙素会逸入血循环,所以血清骨钙素的水平反映了成骨细胞的活性,是骨转换和骨形成的标志。VDR 是已知最可能调节骨钙素的基因,钙三醇对骨钙素水平的调节,是通过 VDR 对骨钙素基因促进因子的反相作用,进而激活位于1号染色体上骨钙素基因而实现的。在体外细胞培养研究中,将骨钙素基因转染细胞,骨钙素基因可被 VDR 激活,而且激活的程度与细胞表面受体数量有

关。鉴于此,Morrison NA 等观察了 VDR 等位基因多态性与血清骨钙素的关系,结果发现,限制性内切酶 BsmI 和 Apa I 等酶切 VDR 基因产生的不同基因型,可以预测血清骨钙素水平,因此认为,VDR 基因的多态性可以预测骨转换。VDR 基因的多态性(BsmI, Apa I, Taq I)依次位于 VDR 的8号内含子(B/b 和 A/a)和9号外显子(T/t)上。VDR 基因的多态性位点可能与某个位于12号染色体上对骨钙素基因起反相作用的反式因子不平衡连锁^[1]。

2 VDR 基因与骨密度的关系

骨质疏松症的病理特点为骨量减少、骨矿密度的降低。骨转换所受的基因影响与骨密度所受的基因影响存在一定的联系,血清骨钙素水平的变化与骨密度的基因多样性有关。Morrison NA 等进一步在双胎研究中分析了 VDR 预测骨密度的可能性,他们选取悉尼和墨尔本地区高加索血统的双胞胎,发现 BB 型(缺乏 Bsm I 限制性酶切位点的纯合子)妇女和 Bb 型妇女分别为平均绝经后18.4年和绝经后22年到达腰椎骨密度的骨折阈值,而 bb 型妇女则要在平均绝经后29年才到达腰椎骨密度的骨折阈值;60岁以上的妇女 BB 型74%骨密度在骨折阈值以下,bb 型则61%骨密度在骨折阈值以上。因此得出结论,VDR 基因多态性可以预测骨密度和骨质疏松骨折风险^[2]。

3 VDR 等位基因的影响因素

基于 Morrison NA 等人开创性的工作,人们针对不同地区和不同种族人群的 VDR 基因多态性在骨质疏松症中的作用及其影响因素展开了广泛的研究。骨量峰值对于骨质疏松是否

发生,其严重程度和骨折阈值都有密切相关。Viitanen 等研究了20~29岁正值骨量峰值的芬兰年轻人,发现 bb 纯合子腰椎和股骨颈 BMD 显著高于 BB 纯合子,说明 VDR 基因多态性与骨量峰值有关^[3]。Keen PW 也分析了 VDR 基因 Taq I 酶基因多态性与绝经妇女骨量丢失率的影响,认为 VDR 基因主要决定骨量峰值,与绝经后骨量丢失无相关性^[4]。Morrison 等人报道,BA_t 和 ba_T 单基因表型的3'-UTR(未翻译区)的变异与 mRNA 的稳定性有关,ba_T 报告基因的活性较 BA_t 低30%^[2]。但 Verbeek W 等在最近的研究中则发现 t 和 T 等位基因 mRNA 的稳定性没有显著差异,认为 VDR 基因的变异是在转录调控上,而不是通过影响 mRNA 的稳定性而实现的^[5]。VDR 基因翻译启动位点的多态性可以用 FoK I 内切酶的限制性片段长度多态性(RFLP)来定义,存在 FoK I 位点的 ff 型有较低的腰椎 BMD 并和髋关节骨量丢失有关^[6]。

研究表明,VDR 等位基因影响了维生素 D 内分泌系统^[7]。在大宗人群研究中发现,低骨密度 VDR 基因(BB 型)与较高的骨钙素和钙三醇基础水平有关^[1,2]。有资料表明补充维生素 D₃ BMD 的影响与 VDR 基因型有一定的关系,补充维生素 D₃ 之前股骨颈 BMD 在 BB、Bb、bb 型之间并无差异,而补充维生素 D₃ 后,BB 和 Bb 型 BMD 的增加值显著高于 bb 型^[8]。

骨量既受遗传因素调控又受钙吸收率影响。Ferrari S 等研究了72例瑞士老年受试者,BB、Bb、bb 不同基因型腰椎骨密度变化不同,BB 型骨量丢失最明显,bb 型骨量丢失则最少。但 BB 型和 bb 型骨密度的变化与每天的钙摄入无关,而 Bb 型骨密度的变化率与钙摄入正相关,提示钙的摄入在维持骨质上与 VDR 基因多态性有关^[9]。另有研究发现,在补充钙的情况下,BB 型和 bb 型绝经后妇女股骨颈 BMD 的丢失速率是一样的,但在低钙摄入时,BB 型的骨量丢失率高于 bb 型。认为可能是改变了肠道 VDR 的状态,使之在低钙摄入的情况下

不能起到部分钙吸收的功能。而且 BB 型在低钙摄入时钙吸收效率降低,呈现出小肠 VDR 基因功能性的缺乏^[10]。

甲状旁腺素(PTH)是体内钙平衡的主要调节因子之一,活性的维生素 D₃ 作用于 VDR,其配体受体复合物结合于 PTH 基因特定的启动子区域,从而抑制转录。Carling T 等认为,b 位点与转录活性和 mRNA 稳定性降低有关,减少 VDR 的表达,从而导致 PTH 升高。并认为 VDR 基因多态性对 PTH 的作用不是通过甲状旁腺细胞表面的钙敏感蛋白而实现的^[11]。肥胖也是一重要影响因素,Bsm I 基因表型中肥胖妇女股骨头 BMD 要显著高于非肥胖妇女,而且 bb 型非肥胖妇女股骨头 BMD 较 BB 型高 5%^[12]。

4 VDR 等位基因在不同人种和人群中的意义

随着上述研究的进行,人们对 VDR 基因在骨质疏松症中的作用有了进一步的认识。但有关 VDR 基因多态性与骨密度之间的关系并不一致,而且在不同的人群中实验重复性差。Morrison 等人的最初研究是在澳大利亚高加索血统人群中进行的,认为缺乏 Bsm I 限制性酶切位点的 B 等位基因与低骨密度有关^[2]。来自意大利、日本比利时和瑞士等国的研究结果证实了这一观点^[9,13-15],高骨密度与 VDR 等位基因 bb(或 aa 或 TT)密切相关,可以预测骨质疏松症骨折风险。但在法国人、丹麦人、韩国人中则无见有此联系^[16-18]。Gunnes M 等在对273名8.2~16.5岁挪威青少年的研究中发现,VDR 等位基因在个体获得骨量峰值上没有意义^[19]。在英国和美国的研究结果不尽相同。Houston LA 在苏格兰东北部发现 BB 型与高骨密度有关,认为 VDR 基因多态性不是 BMD 减少的原因,而是与邻近的致病位点存在连锁不平衡^[20]。即使在美国不同地区高加索血统人群中也得到了不同的结论。Beavan S 等人研究了88例冈比亚人、61例中国沈阳人和78例英国剑桥人的 VDR 等位基因分布状况,结果发现

基因型的频率与种族呈非常显著相关。中国人和冈比亚人的 b 等位基因频率较高,这提示中国人和冈比亚人较高频率的 bb 型与其骨质疏松性骨折的发生率低有关。由此可见,VDR 等位基因与骨质疏松症间的关系存在着种族和人群差异^[21]。

有关双胞胎和家族性的多方面研究已证实骨质疏松症的发病机制中存在着很强的基因成分。可能参与其中的基因包括 I 型胶原、雌激素、维生素 D 受体以及多种细胞因子和生长因子。到目前为止,大多数的研究集中在 VDR 基因。但有关 VDR 基因在骨质疏松症发病机制中的意义尚难作出肯定结论。这一方面可能与种族和人群间的差异有关,也可能在于基因调控多因素的复杂性。

参 考 文 献

- Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, et al. Contribution of transacting factor alleles to normal physiological variability. vitamin D receptor gene polymorphisms and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 6665-69.
- Morrison NA, Qi J, Tokita A, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature*, 1994, 367:284-7.
- Vitonen A, Karkkainen M, Laitinen K, et al. Common polymorphism of the vitamin D receptor gene is associated with variation of peak bone mass in young Finns. *Calcif Tissue Int*, 1996, 59(4):231-4.
- Keen RW, Major PJ, Lanchbury JS, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and bone loss. *Lancet*, 1995, 345:990.
- Verbeek W, Gombart AF, Shiohara M, et al. Vitamin D receptor in evidence for allele-specific mRNA stability in cells which are heterozygous for the Taq I restriction enzyme polymorphism. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 238(1):77-80.
- Gross C, Eccleshall TR, Malloy PJ, et al. The presence of a polymorphism at the transition initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *J Bone Miner Res*, 1996, 11(12):1850-5.
- Howard G, Nguyen T, Morrison N, et al. Genetic influences on bone density: physiological correlates of vitamin D receptor gene alleles in premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995, 80:2800-05.
- Graafmans WC, Lips P, Ooms ME, et al. The effect of vitamin D supplementation on the bone mineral density of the femoral neck is associated with vitamin D receptor gene polymorphisms and change in lumbar spine bone mineral density. *Lancet*, 1995, 345:423-24.
- Ferrari S, Rizzoli R, Chevalley T, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and change in lumbar spine bone mineral density. *Lancet*, 1995, 345:423-24.
- Dawson-Hughes B, Harris SS, Finneran S. Calcium absorption on high and low calcium intakes in relation to vitamin D receptor genotype. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995, 80:3657-61.
- Carling T, Ridefelt P, Hellman P, et al. Vitamin D receptor polymorphisms correlate to parathyroid cell function in primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82:1772-1775.
- Vandevyver C, Wylin T, Cassiman JJ, et al. Influence of the gene alleles on bone mineral density in postmenopausal and osteoporotic women. *J Bone Miner Res*, 1997, 12(2):241-7.
- Gunnes M, Berg JP, Halse J, et al. Lack of relationship between vitamin D receptor genotype and forearm bone gain in healthy children, adolescents, and young adults. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82(3):851-5.
- Houston LA, Grant SF, Reid DM, et al. Vitamin D receptor polymorphism, bone mineral density, and osteoporotic vertebral fracture; studies in a UK population. *Bone*, 1996, 18(3):249-52.
- Vanderyver C, Wylin T, Cassiman JJ, et al. Influence of the vitamin D receptor gene alleles on bone mineral density in postmenopausal and osteoporotic women. *J Bone Miner Res*, 1997, 12(2):241-7.
- Garnero P, Borel O, Sornay RE, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms are not related to bone turnover, rate of bone loss, and bone mass in postmenopausal women; the OFFLY study. *J Bone Miner Res*, 1996, 11(6):827-34.
- Jorgensen HL, Scholler J, Sand JC, et al. Relation of common allelic variation at vitamin D receptor locus to bone mineral density and postmenopausal bone loss; cross-



图1 a. TRAP 染色 分离培养的大鼠 OC 呈哑铃形,细胞浆呈红色,细胞核阴性 200 $\times$; b. TrATPase 染色 分离培养的大鼠 OC 呈漏斗形,细胞浆呈棕褐色颗粒状,细胞核阴性 200 $\times$

3 讨论

已公认酸性磷酸酶与破骨细胞及骨吸收有关,组织化学染色表明破骨细胞胞浆内含有丰富的酸性磷酸酶,但酸性磷酸酶并非破骨细胞所特有,因为成骨细胞也含有少量的酸性磷酸酶,TRAP 与 TrATPase 都是破骨细胞的酸性磷酸酶同功酶,为破骨细胞所特有,通常作为鉴别破骨细胞的重要标志^[3,4]。本文 TRAP 染色结果显示破骨细胞胞浆呈红色,核呈阴性。TrATPase 染色结果破骨细胞胞浆呈棕褐色颗粒状,细胞核呈阴性。TRAP 与 TrATPase 对破骨细胞都较特异,据报道后者特异性更高,推测 ATP 是破骨细胞内 TRAP 的特异性底物^[4]。

本文 TRAP 与 TrATPase 染色结果表明,该酶同样存在于体外培养的破骨细胞内,据此

可将体外培养所获破骨细胞与其他细胞清晰区分,为此可用于观察体外培养破骨细胞的生存时间与药物影响。

参 考 文 献

- 1 Votta BJ, Levy MA, Badger A, et al. Peptide aldehyde inhibitors of cathepsin K inhibit bone resorption both *in vitro* and *in vivo*. *J Bone Miner Res*, 1997, 12: 1396.
- 2 于明香,金慰芳,王洪复. 体外培养破骨细胞的功能观察. *中国骨质疏松杂志*, 1997, 3(3): 3.
- 3 Andersson GN, Marks SC. Tartrate-resistant acid ATPase as a cytochemical marker for osteoclasts. *J Histochem Cytochem*, 1989, 37, 115.
- 4 Lindunger A, Mackay CA, Ek-Rylander B, et al. Histochemistry and biochemistry of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and tartrate-resistant acid adenosine triphosphatase (TrATPase) in bone, bone marrow and spleen; implications for osteoclast ontogeny. *Bone Miner*, 1990, 10: 109.
- 5 section and longitudinal population study. *BMJ*, 1996, 313(7057): 586-90.
- 18 Sung KL, Young SP, Jae MP, et al. Lack of association between vitamin D receptor genotypes and osteoporosis in Koreans. *J Clin Endocr and Metab*, 1995, 80(12): 3677.
- 19 Pacini S, Nicastro L, Aterini S, et al. The determination of BB genotype of vitamin D receptors identifies patients at risk for osteoporosis. *Radiol Med Torino*, 1996, 92(5): 520-4.
- 20 Yamagata Z, Miyamura T, Lijima S, et al. Vitamin D receptor gene polymorphism and bone mineral density in healthy Japanese women. *Lancet*, 1994, 8(344): 1027.
- 21 Beavan S, Prentice A, Yan L, et al. Differences in vitamin D receptor genotype and geographical variation in osteoporosis. *Lancet*, 1996, 348: 136-7.