

## ·论著·

汉族人和法国人 I 型胶原  $\alpha$  链 Spl 结合序列 Msc I 酶切位点基因多态性的比较

陈金标 秦林林 Borel Olivier 张卫 葛崇华 马海波 肖艳霞 Patrick Garnero

**【摘要】** 目的 了解中国汉族人和法国人 I 型胶原  $\alpha$  链 Spl 结合序列 Msc I 酶切位点基因多态性分布的异同。方法 对 96 例中国汉族人和 78 例法国人用 DXA 骨密度仪进行 BMD 测量,同时采集全血并抗凝保存。用聚合酶链式反应、限制性酶切技术对 I 型胶原  $\alpha$  链 Spl 结合序列基因型进行分析。结果 96 例汉族人的基因型均为 SS,78 例法国人的基因型为 53 例 SS、22 例 Ss 和 3 例 ss,经 Fisher  $\chi^2$  检验,显示差异有非常显著性( $P < 0.01$ )。结论 汉族人和法国人的 I 型胶原  $\alpha$  链 Spl 结合序列 Msc I 酶切位点基因多态性显著不同。汉族人 I 型胶原  $\alpha$  链 Spl 结合序列 Msc I 酶切位点稀少。

**【关键词】** I 型胶原  $\alpha$  链基因; Spl 结合序列多态性

Difference in Spl binding site polymorphism at collagen type I  $\alpha 1$  gene between healthy adults of Han nationality and French nationality CHEN Jinbiao<sup>1</sup>, QIN Linlin<sup>1</sup>, Borel Olivier<sup>2</sup>, et al. 1. Department of Isotope Research, Institute of Clinical Medical Sciences, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China; 2. INSERM unit 403, Lyon, France

**【Abstract】** Objective To compare alleles of Spl binding site polymorphism at collagen type I  $\alpha 1$  (COL1A1) gene between Han nationality and French nationality. Methods Bone mineral density was measured by dual-energy X-ray absorptiometry, and the polymorphism of Spl binding site at the COL1A1 gene was determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism in 96 healthy adults of Han nationality and 78 healthy adults of French nationality. Results The Spl polymorphism at the COL1A1 was not found in Han subjects. There were 53 SS homozygotes, 22 Ss heterozygotes, and 3 ss homozygotes in French subjects. The difference between Han and French nationality was significant by Fisher's  $\chi^2$  test ( $P < 0.01$ ). Conclusion There is significant difference in an intronic Spl binding site polymorphism at the COL1A1 gene between healthy adults of Han nationality and French nationality. The alleles of Spl binding site at the COL1A1 gene are rare in Han Nationality.

**【Key words】** COL1A1 gene; Spl binding site polymorphism

骨密度(bone mineral density, BMD)受遗传、激素水平、营养、锻炼及其它因素的影响,其中遗传因素是 BMD 的主要影响因素。影响 BMD 的遗传基因的确认,对于阐明骨质疏松病理生理机制,早期发现骨质疏松高危人群,尽快予以防治具有重要意义。国内赵氏等<sup>[1,2]</sup>对维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)基因限制性内切酶片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)与 BMD 关系进行的研究表明国人汉族 VDR-RFLP 分布与日本人和白种人的不同,并提示不同种族之间,影响 BMD 的基因可能不同。

众多报道认为白种人 I 型胶原  $\alpha$  链 Spl 结合序

列(以下简称 SplBS)Msc I 酶切位点 RFLP 与 BMD 相关<sup>[3-5]</sup>,有关国人汉族人群的 SplBS-RFLP 的分布及其与 BMD 的关系尚未见报道,本文为此比较分析了中国汉族人和法国人的 Spl 基因多态性分布。

### 对象和方法

#### 1. 对象

本研究抽取了北京市汉族女性居民 96 例,年龄 15~74 岁,腰椎和股骨颈 BMD 范围分别为 0.640~1.438 g/cm<sup>2</sup> (CV%  $\approx$  16.4%) 和 0.575~1.391 g/cm<sup>2</sup> (CV%  $\approx$  18.9%);法国男性居民 78 例,年龄 21~70 岁;均已排除患有影响骨代谢性疾病者及有服用影响骨代谢药物史者。

#### 2. 方法

(1) 仪器与试剂:在用聚合酶链式反应(poly-

作者单位:100029 北京,中日友好医院临床医学研究所同位素室(陈金标、秦林林、张卫、葛崇华、马海波、肖艳霞);法国,里昂 INSERM 403 研究室(Borel Olivier, Patrick Garnero)

merase chain reaction, PCR)体外扩增目的基因时,在法国用 CORBETT Research 公司的 FTS-1 型产品;在北京用北京科远生物技术开发部的 TC-96AE 型产品。DNA 提取试剂盒购自 QIAGEN 公司;内切酶 Msc I 购自 New England Biolabs 公司;含错配碱基的引物按文献<sup>[3]</sup>报告的序列合成。

(2)DNA 提取:采用 QIAamp blood kit 提取抗凝全血的 DNA。

(3)目的基因的扩增、限制性内切酶消化及电泳确定基因型:所用引物序列如下:上游为 5'-GTC-CAGCCCTCATCTGGCC-3', 下游为 5'-TAACTTCTG-GACTATTTGCGGACTTTTGG-3'。用 PCR 体外扩增目的基因,其反应总体积为法国 20  $\mu$ l、北京 30  $\mu$ l,模板用量每反应约为 0.2  $\mu$ g。在北京时的 PCR 循环反应条件如下:开始循环前于 95℃ 变性 5min 后,按 95℃ 变性 1.5 min, 55℃ 复性 1.5 min, 72℃ 延伸 1.5 min 的条件进行 35 次循环,完成后再于 72℃ 延伸 5 min。在法国时的 PCR 反应条件如下:先于 95℃ 变性 3 min、55℃ 复性 1.0 min, 74℃ 延伸 2.0 min 下反应一循环后,按 95℃ 变性 5 s, 55℃ 复性 5 s, 74℃ 延伸 30 s 的条件进行 40 次循环,完成后再于 74℃ 延伸 3 min。经电泳鉴定后,取 PCR 产物于 37℃ 用限制性内切酶 Msc I 消化过夜。取酶切产物于 3.0% 琼脂糖凝胶上电泳。经溴化乙锭染色后,在紫外透射仪下确定 SplBS 基因型。缺乏相应多态性位点的样品基因条带位置在 264 bp 附近,以大写字母 S 表示;存在多态性位点的样品,即存在 G→T 点突变的 SplBS 基因在 246 bp 附近有一特异性条带(18 bp 的小片段产物在电泳时已被泳入缓冲液中),以小写字母 s 表示。

3. 统计学处理:采用 Fisher  $\chi^2$  检验方法进行分析,确定  $P < 0.05$  为差异有显著性,  $P < 0.01$  为差异有非常显著性。

## 结 果

### 1. PCR 产物消化电泳结果

根据电泳显示酶切片段的大小来确定 SplBS 基因型。由于在电泳时,18 bp 大小的片段已被泳入缓冲液中,故存在多态性位点的纯合子(ss)只显示 246 bp 条带,缺乏该位点的纯合子(SS)显示 264 bp 条带,杂合子(Ss)则显示上述 2 条带,见图 1。

2. 汉族人和法国人 Spl 基因多态性分布的比较  
96 例汉族人和 78 例法国人进行的 PCR-RFLP

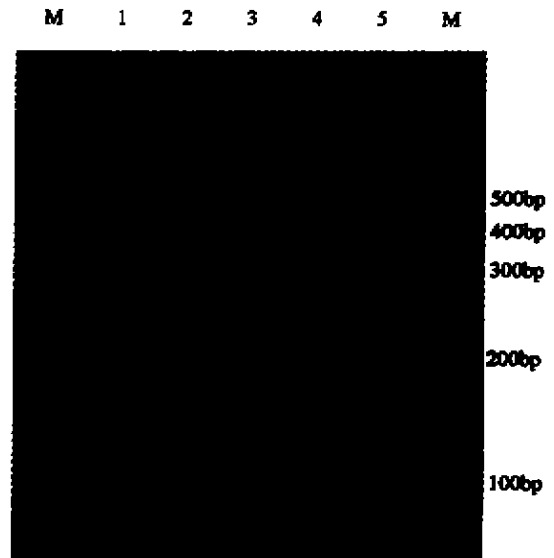


图 1 PCR-RFLP 确定 Spl 基因型

CI、C2 为汉族人标本, F1、F2、F3 为法国人标本, M 为 100 bp

分析结果表明汉族人只有 SS 基因型,而法国人有 53 例 SS、22 例 Ss 和 3 例 ss 基因型,其百分比分别为 67.9%、28.2% 和 3.8%,两者不同,其差异有非常显著性( $P < 0.01$ ),见表 1。

表 1 Spl 基因型在不同人群的分布

| 基因型 | 汉族女性<br>(n = 96) | 法国男性<br>(n = 87) | 法国女性 <sup>[4]</sup><br>(n = 220) | 英国女性 <sup>[3]</sup><br>(n = 94) |
|-----|------------------|------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| SS  | 96*              | 53               | 134                              | 63                              |
| Ss  | 0*               | 22               | 77                               | 30                              |
| ss  | 0*               | 3                | 9                                | 1                               |

\* 与法国男性比较,  $\chi^2 = 35.93$ ,  $P < 0.01$

## 讨 论

双生子研究和家系调查已经表明遗传因素对骨量有巨大的影响。Morrison 等<sup>[6]</sup>首先报道了 VDR 基因多态性和 BMD 的关系,而引起众多研究者对基因和 BMD、骨折的关系进行广泛研究的热忱,对众多候选基因进行了相关的研究。国内也有文献报道了 VDR 基因<sup>[2]</sup>、雌激素受体基因多态性<sup>[7]</sup>和 BMD 的关系。

I 型胶原是骨骼中的主要胶原成分,是由 COL1A1 和 COL1A2 两种基因编码的三股螺旋分子。基于 COL1A1 和 COL1A2 编码区的突变能导致严重的骨质疏松<sup>[9]</sup>,它们被强烈认为是影响骨骼的候选基因,Grant 等<sup>[3]</sup>分析了 COL1A1 转录控制区的基因,发现 SplBS 基因多态性和 BMD、骨质疏松有关。最近

McGuigan 等<sup>[10]</sup>的研究进一步认为 SpIBS 基因多态性可能通过改变基因的调节使骨折更易发生,而不是一个简单的疾病标志。虽本研究二个人群的性别不同,但在本研究的 78 例法国男性人群中,SpIBS 基因型分布和女性人群的无差异,且已报道法国绝经前女性 SpIBS 多态性和 BMD 相关<sup>[4]</sup>。另有研究认为在男女性人群中 SpIBS 多态性均和腰椎骨折相关。

有众多的文献已经表明不同种族间的骨量不同,亚洲人的骨量比白人低<sup>[12]</sup>。虽其原因目前尚未调查清楚,但是遗传因素已被认为是一个重要的因素。在可能影响骨量的众多候选基因中,已发现中国人 VDR 基因型分布与外国人的不同<sup>[8]</sup>。在本研究的 96 例汉族人中,虽 BMD 值有较大变异,但没有发现任何 SpIBS 的 Msc I 限制性酶切位点,与法国人的 SpIBS-RFLP 分布不同( $P < 0.01$ )。Han 等<sup>[11]</sup>报道在 200 例朝鲜族人中未发现 SpIBSMsc I 酶切位点;用 PCR-SSCP 技术分析了 100 例朝鲜人的 SpIBS,也未发现另外的突变位点。从人种学角度看,汉族人与朝鲜族人很接近,故本研究认为 Spl 结合序列 G→T 的突变在汉族人中可能极少,SpIBS 可能不是影响中国汉族人 BMD 的主要基因。

总之,本研究认为汉族人 I 型胶原  $\alpha$  链 Spl 结合序列 Msc I 酶切位点在汉族人中可能极少,其分布和法国人的不同;SpIBS 可能不是影响汉族人 BMD 的主要基因。

## 参 考 文 献

- 1 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.中国医学科学院学报,1997,19(1):18-23.
- 2 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.中国医学科学院学报,1997,19:252-256.
- 3 Grant SFA, Reid DM, Blake G, et al. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Spl binding site in the collagen type I  $\alpha 1$  gene. Nat Genet, 1996, 14(10):203-205.
- 4 Garnero P, Borel O, Grant SFA, et al. Collagen I  $\alpha 1$  polymorphism, bone mass, and bone turnover in healthy French premenopausal women: The OFELY study. J Bone Miner Res, 1998, 13:813-817.
- 5 Langdahl BL, Rastan SH, Grant SFA, et al. An Spl binding site polymorphism in the COL1A1 gene predicts osteoporotic fracture in both men and women. J Bone Miner Res, 1998, 13:1384-1389.
- 6 Morrison NA, Qi JC, Tokita A, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. Nature, 1994, 367:284-287.
- 7 黄琪仁,王钦红,张良平,等.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.中国骨质疏松杂志,1998,4:38-42.
- 8 闫丽娅,王晓红,张卉,等.VDR 基因型分布及其与骨矿含量的关系.中国骨质疏松杂志,1997,3(2):19-21.
- 9 Sykes B. Bone diseases cracks genetics. Nature, 1990, 348:18-20.
- 10 McGuigan FEA, Reid DM, Rastan SH. Susceptibility to osteoporotic fracture is determined by allelic variation at the Spl site, rather than other polymorphic sites at the COL1A1 locus. Osteoporosis Int, 2000, 11:338-343.
- 11 Han KO, Moon IG, Hwang CS, et al. Lack of an intronic Spl binding-site polymorphism at the collagen type I  $\alpha 1$  gene in healthy Korean women. Bone, 1999, 24:135-137.
- 12 Russell-Aulet M, Wang J, Thornton JC, et al. Bone mineral density and mass in a cross-sectional study of white and Asian women. J Bone Miner Res, 1993, 8:575-582.