

· 论 著 ·

骨质疏松症的生态遗传学系列研究：
前臂骨密度连锁的染色体区域

王国英 牛天华 洪秀梅 杨建华 吴淦 王朝曦 方治安 王滨燕

【摘要】 目的 为了确定前臂骨密度的遗传因子,对来源于96个核心家庭的218名后代进行了常染色体基因组扫描,旨在研究前臂骨密度与染色体的连锁证据。方法 应用荧光标记引物对367个常染色体基因组微卫星生物标记物进行基因型测定,应用pDXA法测定前臂近端和远端的骨密度。结果 前臂骨密度与D2S2141、D2S1400和D2S405,以及前臂远端骨密度与D13S788和D13S800具有连锁关系。结论 在中国人群中经性别、年龄调整后的前臂骨密度与第2和13号染色体某些区域相关。

【关键词】 骨质疏松症; 骨密度; 微卫星生物标记物; 染色体

Serial ecogenetical studies on osteoporosis; chromosome regions linked to forearm bone mineral density
WANG Guoying¹, NIU Tianhua², HONG Xiumei², et al. 1. Ecogenetics and Reproductive Health Center of Beijing University, The Third Affiliated Hospital of Beijing University, Beijing 10083, China; Institute of Biomedicine, Anhui Medical University, Anqing 246001, China

【Abstract】 Objective To search systematically for chromosomal regions containing genes that regulate bone mineral density (BMD), we scanned the entire autosomal genome among 218 individuals from 96 nuclear families collected from Anqing. **Methods** 367 microsatellite polymorphic markers were genotyped by using fluorescein-labelled primer, and forearm BMD was measured by pDXA. **Results** Linkage analysis showed the evidences of linkage between markers D2S2141, D2S1400, D2S405, D13S788 and D13S800 and forearm BMD. **Conclusion** A couple of chromosome 2 and 13 regions may be linked to the adjusted forearm BMD in the Chinese population.

【Key words】 Osteoporosis; Bone mineral density; Microsatellite polymorphic markers; Chromosome

骨质疏松是一种世界各国日益关注的公共卫生问题,其主要特征是骨密度下降、骨脆性增加、易发骨折。美国近期报道的骨质疏松症人数已达二千五百万人。每年骨质疏松症患者的卫生经费支出多达130亿美元。我国虽无全国性对应数字。但区域性流行病学调查和医疗卫生统计显示在城市地区骨质疏松症患病率及患者人数均有上升趋势。世界卫生组织提出,随着社会老龄化进程,骨折将成为严重影响全球中老年人群和社会生活质量的四大健康问题之一。据估计九十年代全球髋骨骨折的1/3人数来自亚洲。这个比例到本世纪中叶将升至1/2,且绝大多数患者将会出现在中国。因此研究骨质疏松症的发病机制,特别是认识遗传因素的作用及其与特定环境营养因素的交互作用将对骨质疏松症的预防、高危人群的早期发现、早期保护和治疗、减少并发

症,对中国迎接即将来临的巨大公共卫生和医疗服务挑战,具有重要的现实意义。

既往大量的前瞻性和断面流行病学研究已充分证实了低骨密度本身是一个最有效的预知骨质疏松症的观测指标^[1]。在中国人群中开展的骨质疏松症的病因学研究已有不少,特别侧重对其危险因素进行观察报道。在中国人的骨折病例-对照研究也证实病例组骨密度显著低于对照组。骨折发生随年龄呈指数增长的同时,骨密度也骤然下降^[2]。另外在中国人群中的研究还提示社会、人口与环境因素、如年龄、停经、体重系数、吸烟等也是骨折发生的危险因素^[3]。目前虽然已找到维生素D受体基因和雌激素受体基因可能有助于认识骨质疏松症的遗传学机制,但骨质疏松症的遗传学研究,特别是基于大样本人群的分析成果甚少。在中国人群中所开展的骨质疏松症或低骨密度的群体遗传学研究更加为数寥寥。

为系统寻找调节骨密度的基因在染色体上的可

作者单位:100883 北京大学生态遗传与生殖卫生研究中心(王国英、王朝曦)第一作者现在地址:北京大学第三医院内分泌科,安徽医科大学(牛天华、洪秀梅、杨建华、吴淦、方治安、王滨燕)

能区域,本研究对 96 个核心家系中的 218 名个体进行常染色体全基因组扫描(包含 367 个多肽标记物),同时对前臂骨密度(BMD)进行了观测,通过年龄性别调整,探讨中国人群中与前臂骨密度表型连锁的基因所在的可能区域。

研究对象和方法

1. 研究对象

从安庆地区 3 个乡镇的高血压人群中选取 96 个核心家庭共 218 人。除 2 人外,其均来自具有父母的核心家系,所有研究对象年龄为 15~55 岁,全部参加骨密度遗传学研究的对象均填写了经伦理委员会认定的知情同意书。

2. 方法

(1)骨密度测定:前臂近端和远端的骨密度应用 pDXA 测定,单位为 g/cm^2 。该仪器的敏感性可达 98%^[4]。

(2)DNA 提取和基因型测定:取静脉血 10 ml,应用标准的化学沉淀法和 puregene DNA 分离试剂盒提取基因组 DNA。应用标准化的程序和荧光标记的引物对 218 例样本进行了 367 个微卫星生物标记物的基因型测定。

(3)统计学分析:使用 SAS(6.12)统计分析软件包进行资料分析,前臂近端和远端骨密度值分布及其 log10 转化后均不符合正态分布。对年龄和性别的控制后,使用多元线性回归对调整后的骨密度值进行连锁分析。应用相应的软件进行多点分析来探测连锁以及对 LOD > 2.0 的生物标记物进行单点非参数患病同胞对连锁分析。应用模拟基因组扫描方法进一步验证连锁的存在。

结 果

1. 研究对象特征

研究对象中 82 人来自父母双亲均在的 63 个核心家庭,12 人来自只有父亲或母亲的单亲家庭,只有 2 人无父母。其人口及社会学临床特征详见表 1。

表 1 研究对象特征

变量	平均值($\bar{x}$)	标准差(s)
年龄(岁)	30.3	6.3
体重(kg)	58.6	8.5
身高(cm^2)	162.6	8.1
BMI(kg/cm^2)	22.1	2.7
前臂近端 BMD(g/cm^2)	1.01	0.52
前臂远端 BMD(g/cm^2)	0.60	0.56

注: BMI 为体重指数

2. 连锁分析

对经年龄、性别调整后的前臂近端和远端骨密度的测量结果发现前臂骨密度值与第 2 号染色体上覆盖生物标记物 D2S2976 - D2S405 区域存在连锁关系,其前臂近端多点 LOD = 2.15,前臂远端多点 LOD = 2.14。前臂近端骨密度测量值与第 13 号染色体上 D13S788 - D13S800 生物标记物区域存在连锁,多点 LOD = 1.67,结果见表 2。对 D2S405 的单点分析表明调整的前臂远端骨密度的平方差与共有的等位基因平均频率 π 成显著负相关($\beta = -0.253, P < 0.05$)。调整的前臂近端骨密度的平方差与共有的等位基因平均频率 π 之间有相关的趋势($\beta = -0.285, P = 0.06$)。

表 2 前臂骨密度提示连锁的区域

骨质疏松症表型	染色体	生物标记物提示连锁区域	LOD 值
前臂近端骨密度	2	D2S2976, D2S1400, D2S405	2.15
前臂远端骨密度	2	D2S2976, D2S1400, D2S405	2.14
	13	D13S788, D13S800	1.67

3. 关联分析和混杂因素的控制

对前臂近端和远端骨密度测量结果关联分析表明两者之间存在显著正相关, $r_{\text{近端,远端}} = 0.96, P < 0.001$ 。

骨密度测量结果与收缩压和舒张压之间均无显著相关,见表 3。

表 3 前臂近端、远端骨密度与血压的相关性

变量	相关系数	P 值
前臂近端与收缩压	0.06	$P > 0.10$
前臂近端与舒张压	0.04	$P > 0.10$
前臂远端与收缩压	0.04	$P > 0.10$
前臂远端与舒张压	0.04	$P > 0.10$

讨 论

众所周知年龄对骨代谢有很大的影响,35 岁以前骨量的增加多于骨量的减少,骨量在 30~35 岁达到峰值。最大骨量峰值又受多种因素的影响,包括性别,体育锻炼,饮食,吸烟,饮酒和肥胖等。一些研究发现骨密度峰值明显与体重指数(BMI)相关^[5],推测控制体重指数的基因也可能参与骨密度的调节和决定骨质疏松症骨折的发生^[6]。因此在我们的多变量模型中只对年龄和性别两个影响因素作了调整。

我们注意到前臂近端和远端的组织构成不同,

前臂近端几乎全部由皮质骨组成,而前臂远端的组成成分含皮质骨和骨小梁,虽然这两个性状是高度相关的,但是每个位点的遗传因素是不同的,因此我们分别对前臂近端和远端骨密度进行了分析。

本研究结果发现前臂骨密度值与染色体 2p21.1-24 区域连锁, (LOD = 2.15)。一些研究发现该区域与其他表型也存在连锁关系,如脊椎骨密度与染色体 2p23-24 区域连锁 (LOD = 2.25)^[7] 染色体 2p21 区与血清 Leptin 水平显著相关 (LOD = 4.95)^[8]。先天性青光眼 (GLC3) 基因定位于染色体 2p21 (LOD = 11.50)^[9]。还有一些候选基因也位于这个染色体区域,如编码一种钙调节激素的基因 CALM2 位于第 2 号染色体 D2S405 附近,动物实验研究表明钙调节激素可以减少骨密度^[10],其原因可能与其参与成纤维细胞分化而影响前臂骨密度^[11]。另一个候选基因肾上腺皮质激素前体 (POMC) 基因位于染色体 2p21。POMC 作用于肾上腺皮质,引起糖皮质激素的产生,而糖皮质激素可以减少钙的吸收及增加肾脏对钙的排除,因此与肥胖和肾上腺功能不全相关的 POMC 基因突变^[12]可能对控制前臂的 BMD 起重要作用。

近几年对一些与骨密度相关的候选基因进行了有关研究,包括位于染色体 12q12-q14 维生素 D (1,25-二氢维生素 D3) 受体基因 (VDR),位于染色体 6q25.1 的雌激素受体基因 (ER),位于染色体 17q21.3-q22.1 的胶原 1 α 1 (COL1A1) 基因,和位于染色体 7q21.3-q22.1 胶原 1 α 2 (COL1A2) 基因,但对这些候选基因多态性研究的报道多为阴性结果。本试验也未发现这些区域与前臂骨密度的连锁关系。

总之,本研究采用全基因组扫描技术对中国人前臂骨密度相关染色体区进行了测定,分析结果

发现在中国人群中经性别、年龄调整后前臂骨密度与第 2 和 13 号染色体某些区域相关。该分析结果对骨密度的遗传特征和骨质疏松症的遗传学致病机制的认识具有重要的参考价值。

参考文献

- 1 Hui SL, Slemendat CW, Johnston CC. Baseline measurement of bone mass predicts fracture in white women. *Ann Intern Med*, 1989, 113: 355-361.
- 2 Yang RS, Liu TK, Dorey FJ, et al. Bone mineral density in Chinese elderly women with hip fracture. *Calcif Tissue Int*, 1996, 58: 385-389.
- 3 Shaw CK. An epidemiologic study of osteoporosis in Taiwan. *Ann Epidemiol*, 1993, 3: 264-271.
- 4 Xu X, Liu T, Chen C, et al. Forearm bone mineral density in Chinese women: a community-based study. *J Clin Densitometry*, 1998, 1: 149-156.
- 5 Sowers M, Kshirsagar A, Crutchfield M, et al. Body composition, age and femoral bone mass of young adult women. *Ann Epidemiol*, 1991, 1: 245-254.
- 6 Willing MC, Torner JC, Burns TI, et al. Determinants of bone mineral density in postmenopausal white women. *J Gerontol A Biol Sci*, 1997, 52: M337-M342.
- 7 Devoto M, Shimoya K, Carmona J, et al. First-stage autosomal genome screen in extended pedigrees suggests genes predisposing to low bone mineral density on chromosomes 1p, 2p and 4q. *Eur J Hum Genet*, 1998, 6: 151-157.
- 8 Comuzzie AG, Hixson JE, Almasy L, et al. A major quantitative trait locus determining serum leptin levels and fat mass is located on human chromosome 2. *Nat Genet*, 1997, 15: 273-276.
- 9 Sarfarazi M, Akarsu AN, Hossain A, et al. Assignment of a locus (GLC3 A) for primary congenital glaucoma (buphthalmos) to 2p21 and evidence for genetic heterogeneity. *Genomics*, 1995, 30: 171-177.
- 10 Lehman WL, Solomons CC, Hollister JR. Calmodulin activity in corticosteroid-induced osteopenia. *Clin Orthop*, 1984, 187: 300-307.
- 11 Siddhanti SR, Quarles LD. Molecular to pharmacologic control of osteoblast proliferation and differentiation. *J Cell Biochem*, 1994, 55: 310-320.
- 12 Krude H, Bichermann H, Luck W. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet*, 1998, 19: 155-157.

作者来稿请寄:北京市朝阳区小营路9号亚运豪庭A座5F室

《中国骨质疏松杂志》编辑部

邮政编码 100101