

·论著·

绝经后妇女雌激素受体(ER)基因 Xba I 限制性片断长度多态性(RFLP)与骨密度的关系

朱汉民 刘建民 许曼音 陈家伦 朱晓颖 戴蒙

【摘要】 目的 研究绝经后妇女 ER 基因 Xba I 限制性片断长度多态性(RFLP)与骨密度、骨生化指标和停经年限的关系。方法 用 PCR-RFLP 方法检测绝经后妇女的 ER 基因型;DEXA 检测腰椎和股骨各处骨密度,同时测定血钙素、尿吡啶并酚等骨转换指标。结果 在 205 例绝经后妇女中发现 XX、Xx 和 xx 基因型频率分别为 6.8%、25.9% 和 67.3%,XX 基因型的妇女虽然停经时间更长,但腰椎骨密度仍高于 Xx 和 xx 型。结论 ER 基因 XX 型可能对腰椎骨量的维持有一定作用。

Association of Xba I restriction fragment length polymorphism(RFLP)of estrogen receptor(ER)gene and bone mineral density in postmenopausal women. ZHU Hanmin, LIU Jianmin, ZHU Xiaoyin, et al. Department of Geriatric, Hua Dong Hospital, Shanghai, 20042, China

【Abstract】 Objective Study the relationships among Xba I restriction length polymorphisms(RFLP) of estrogen receptor(ER)gene, bone mineral density(BMD)and bone turn over rate in postmenopausal women. **Methods** BMD were measured at lumbar-spine and proximal femoral in 205 postmenopausal women, biochemical markers, such as osteocalcin(BGP)and pyridinoline(Pyd), etc. were also measured. The genotypes of ER were detected by PCR-RFLP method. **Results** The ER genotyping is as follow: XX(6.8%), Xx(25.9%) and xx(67.3%). Women with XX genotype have higher lumbar spine bone mass comparing those with Xx and xx ones, although they had longer period since menopause. **Conclusion** This result indicated that the XX genotypes of ER gene may have some protective effects on lumbar spine bone mass.

骨质疏松是一种以骨量减少、骨组织显微结构退化为特征,导致脆性增加、骨折危险性升高的全身性疾病^[1]。骨质疏松是一种多因素、多基因的疾病,受遗传、全身激素和局部细胞因子等因素的控制。Morrison 等发现 VitD 基因多态性与骨密度和转换有关,并认为该基因的多态性对骨密度的遗传影响要占到 75%^[2]。然而,对此也有许多不同的观点。

雌激素对骨量峰值的取得起重要作用,同时它是增加骨量、防止骨丢失的重要激素。绝经后雌激素下降会引起骨量的快速丢失,骨折发生率上升。利用 PvuII 和 XbaI 这两种限制性内切酶对 ER 基因第 1 内含子进行限制性片断长度多态性(RFLP)分析,Kobayashi 等^[3]在 1996 年首次报道了绝经后妇女的骨密度与 ER 基因的 RFLP 有关。因此,ER 基因已成为骨质疏松的候选基因之一。

本研究对绝经后妇女的 ER 基因 XbaI 多态性进行了初步分析,并就其与腰椎和股骨骨密度、绝经年

限和反映骨转换的骨生化指标之间的相互关系作了探讨。

材料和方法

1. 研究对象

自然绝经后妇女 205 例,平均年龄 64.9 ± 0.6 岁,平均绝经年限 16.2 ± 1.3 年。患有各种可能影响骨代谢的疾病和正在服用可能影响骨代谢的药物者不入选。

2. 方法

(1)骨密度测定:用双能 X 线骨密度仪(DEXA)(Norland, XR-36)测定患者腰椎 L₂₋₄ 前后位、侧位;左股骨颈、大转子及 Ward's 三角处骨密度。

(2)骨生化指标:血清碱性磷酸酶(AKP):对硝基苯磷酸盐法;血清骨钙素(BGP):ELISA 法(Metra Biosystems, 美国);尿吡啶并酚(Pyd):ELISA 法(Metra Biosystems, 美国)。

(2)ER 基因 XbaI 基因型多态性分析:从绝经后妇女外周血中抽提 DNA(DNA 抽提试剂盒,上海华顺公司),PCR 扩增 ER 基因第 1 内含子多态性区

作者单位:200040 上海华东医院老年医学研究所(朱汉民、朱晓颖);上海第二医科大学附属瑞金医院内分泌科(刘建民、许曼音、陈家伦);上海市内分泌研究所(戴蒙)

域: 上游引物: 5'-CTGCCACCCTATCTGTATCTTTTCCTATCTCC-3', 下游引物: 5'-TCTTTCTCTGCCACCCTGGCGTCGATTATCTGA-3'^[1] (由上海瑞金医院分子医学中心合成), PCR 循环条件为: 95℃ 预变性 4 分钟; 94℃ 变性 30 秒, 59℃ 退火 30 秒, 72℃ 延长 45 秒, 共 30 个循环; 72℃ 再延长 5 分钟 (DNA 热循环仪 480 型: Perkin-Elmer)。将 PCR 产物与 5 单位 XbaI 内切酶 (MBI) 公司在 37℃ 中水浴 4 小时。最后将酶解产物在 70V 电压下进行 1.5% 琼脂糖凝胶 (含 0.2μg/ml 溴乙锭) 电泳 30 分钟。于紫外灯下观察结果, 摄影。

(4) 统计, 数据以均数 ± 标准误表示, 采用 *t*-检验进行显著性检验。

结 果

1. ER 基因的 XbaI 基因型

ERA 基因的第 1 内含子内, 距第 2 外显子上游约 350 处可有 XbaI 限制性片断长度多态性 (RFLP): XbaI 识别位点上可出现一个 A→G 突变, 据此可对 PCR 产物进行酶切分析。无酶切位点的用大写字母表示, 有酶切位点的用小写字母表示。

ER 基因的扩增片断长 1.3kb。XbaI 酶切后的片断为 900 和 400bp。无酶切位点的纯合子仅 1.3kb 一个条带, 以 XX 表示; 有酶切位点的纯合子有 900 和 400bp 两条条带, 以 xx 表示; 杂合子有 1.3kb、900 和 400bp 三条, 以 Xx 表示 (图 1)。

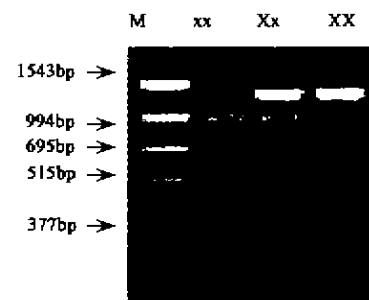


图 1 ER 基因的 XbaI 基因型

在我们所检测的样本中发现了 XX、Xx 和 xx 3 种基因型。各基因型在绝经后妇女中的分布以及各种基因型妇女的年龄、绝经年限和体重指数资料, 见表 1。其中, XX 型妇女的绝经年限显著大于 Xx 型和 xx 型 (表 1)。

表 1 绝经后妇女的基因型和一般背景材料

指标	XX	Xx	xx
基因频率 (%)	6.8	25.9	67.3
年龄 (岁)	67.0 ± 2.9	63.6 ± 1.2	64.1 ± 0.8
绝经年限 (年)	22.0 ± 2.7 ⁺⁺	15.0 ± 1.3	15.3 ± 0.8
体重指数 (kg/m ²)	23.4 ± 1.6	23.6 ± 0.6	22.9 ± 0.3
AKP (IU/L)	92.8 ± 6.5	100.5 ± 5.4	102.3 ± 5.23
BGP (ng/ml)	11.0 ± 0.9	13.0 ± 2.6	10.0 ± 60.4
Pyd/Cr (nmol/nmolCr)	39.2 ± 5.1	31.6 ± 3.5	37.1 ± 2.7
L ₂₋₄ (Z 值)	-0.507 ± 0.527 ^{*v}	-1.390 ± 0.137	-1.414 ± 0.112
股骨颈 (Z 值)	-0.371 ± 0.390	-0.288 ± 0.136	-0.118 ± 0.099
大转子 (g/cm ²)	0.467 ± 0.046	0.523 ± 0.015	0.525 ± 0.011
Ward's 三角 (g/cm ²)	0.431 ± 0.044	0.465 ± 0.017	0.459 ± 0.013

注: +: 与 Xx 型相比, $P < 0.05$; ++: 与 xx 型相比, $P < 0.02$; v: 与 xx 型相比, $P < 0.05$

XX 型的妇女 L₂₋₄ 骨密度 Z 值明显高于 Xx 型和 xx 型。3 组的股骨各处骨密度没有区别 (表 1)。

3. 基因型与骨生化指标的关系

血 AKP、BGP 和尿 Pyd/Cr 在各种基因型中没有区别 (表 1)。

4. 绝经年限和基因型对骨密度的影响

在将研究对象按绝经年限分为 < 5 年组、5 ~ 10 年组和 > 10 年组的基础上, 进一步在同一绝经年限组中按 ER 基因型分组。

在停经不足 5 年的妇女中, Xx 型的腰椎骨密度 Z 值高于 xx 型 (-1.23 ± 0.27 vs. -2.15 ± 0.28g/

cm², $P < 0.05$)。

在停经 5 年以上但不足 10 年的妇女中, 虽然 Xx 型的腰椎骨密度高于 xx 型 (-1.44 ± 0.11 vs. -1.65 ± 0.31g/cm²), 但未达统计意义的差别。

在绝经 10 年以上的妇女中, XX 型的腰椎骨密度 Z 值高于 Xx 型 (-0.44 ± 0.62 vs. -1.43 ± 0.19g/cm², $P < 0.05$), 但与 xx 型 (-1.17 ± 0.12g/cm²) 没有区别。

上述各组内不同基因型妇女的股骨颈和骨生化指标均无差异。

讨 论

绝经后妇女由于雌激素下降,骨密度快速下降^[4]。激素替代疗法(HRT)可以预防和治疗绝经后骨量丢失^[5],人成骨细胞和破骨细胞上都有雌激素受体(ER)^[6],清楚地表明了雌激素在骨代谢中的重要作用。1994年,Smith等人报道了一例28岁男性因雌激素受体突变,造成雌激素抵抗,而该患者的骨密度还低于15岁男孩均数的2个SD^[7]。剔除ER基因的小鼠骨密度低于野生型小鼠的骨密度20~25%^[8]。这充分说明雌激素受体基因突变对骨质疏松的发生具有重要意义。因此,对ER基因的变化进行研究将有助于深入了解绝经后骨质疏松的遗传背景。

本文对绝经后妇女的激素受体基因XbaI限制性片段长度多态性与骨密度、骨生长指标等的关系进行了研究,发现其基因型分布频率与韩国、日本的有关报道基本一致^[3,9]。

ER基因型可能对腰椎和股骨的骨密度有一定影响。分析XbaI基因型与骨密度的关系后发现,XX型的腰椎骨密度明显高于Xx型,这也与Kobayashi^[3]和Gennari^[10]等的研究结果相似。

值得注意的是本研究中XX型妇女的绝经年限高于Xx型。骨量峰值和绝经后的骨转换速度是影响骨密度的两大因素。XX型和Xx型、xx型绝经后妇女的骨生化指标,如血AKP、BGP和尿Pyd排出量没有差别,说明她们的骨转换速度是相同的。因此,对停经时间更长的XX型妇女腰椎骨密度反而更高这一现象的最可能解释是她们在绝经前的骨量或骨峰值比Xx型高。

Mizunuma等^[11]的研究结果为这一解释提供了另一个有用的证据:他们研究了绝经前妇女的腰椎骨密度和ER基因多态性的关系,发现xx型的绝经前妇女骨密度明显低于同样是绝经前的Xx型妇女。我们也对绝经后妇女按停经年限进行了分组,同样发现停经不足5年的Xx型的腰椎骨密度高于xx型,到了绝经10年以后,XX型的腰椎骨密度仍然高于Xx型。综合这些研究结果,是否可以假设XbaI基因型可能对骨量峰值的取得有一定的影响,并进一步延伸到绝经后,其中以XX型对腰椎骨量的维持作用最为明显。

但也有一些研究提出了不同的观点。在韩国绝经后妇女中并未发现ER基因型与骨密度的关

系^[9]。

XbaI的限制性酶切位点位于ER基因的第1内含子,目前还不清楚内含子多态性是怎样影响ER功能和骨密度的。该基因多态性本身可能并不是直接影响骨密度的原因,但它与某个尚未发现的位于ER基因附近的致病位点连锁不平衡。这也就解释了为什么在不同的人群中基因型与骨密度的关系不一致的现象。另外已有文献报道,某些内含子含有一定调节序列,会影响到蛋白质的合成^[12]。ER基因多态性是否与外显子突变有关,从而造成ER蛋白功能改变还有待研究。

综上所述,我们发现雌激素受体基因的XX型对腰椎骨密度的维持有意义,检测ER基因的变化将有助于认识骨质疏松的发病机制,为早期发现高危人数,尽早进行诊断和治疗提供依据。

参 考 文 献

- 1 Consensus Development Conference. Prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Am J Med*, 1994; 90:107-110.
- 2 Morrison NA, Qi JC, Tokita A, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature*, 1994; 367:284-287.
- 3 Kobayashi S, Inoue S, Hosoi T, et al. Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene. *J Bone Miner Res*, 1996; 11:306-311.
- 4 Poulides JM, Tremolieres F, Ribot C. The effects of menopause on longitudinal bone loss from the spine. *Calcif Tissue Int*, 1995; 52:340-343.
- 5 Heaney RP. Pathophysiology of osteoporosis. *Endocrinol & Metab Clin of North Am*, 1998; 27:255-265.
- 6 Oursler MJ, Oschoby P, Pyffereon J, et al. Avian osteoclasts as estrogen target cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 88:6613-6617.
- 7 Smith EP, Boyd J, Frank GR, et al. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen gene in a man. *N Engl J Med*, 1994; 331:1056-1061.
- 8 Korach KS. Insights from the study of animal lacking a functional estrogen receptor. *Science*, 1994; 266:1524-1527.
- 9 Han KO, Moon IC, 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 Endocrinol Metab*, 1997; 82:991-995.
- 10 Gennari L, Bechermu L, Masi L, et al. Vitamin D and estrogen receptor allelic variants in Italian postmenopausal women: Evidence of multiple gene contribution to bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998; 83:939-944.
- 11 Mizunuma H, Hosoi T, Okano H, et al. Estrogen receptor gene polymorphism and bone mineral density at the lumbar spine of pre- and postmenopausal women. *Bone*, 1997; 21:379-383.
- 12 Laurie CC and Sam LF. The effect of an intronic polymorphism on alcohol dehydrogenase expression in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 1994; 138:379-385.