

上海地区汉人维生素 D 受体基因多态性与骨密度关系的初步分析

缪应新 朱汉民 朱晓颖 甘洁民 陈淑英

【摘要】 目的 了解维生素 D 受体(VDR)基因多态性在中国人群中的分布,并进一步研究其与骨密度的关系。方法 通过聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法分析了 348 例无亲缘关系的上海地区男女居民的 VDR 基因型,并用双能 X 线吸收仪测定了其中 202 例骨密度。结果 348 例研究对象中 bb 型占 81.9%,Bb 型占 18.1%,未见 BB 型。b 等位基因在本组人群中分布高达 90.0%。男女性之间 VDR 基因型分布频率无明显区别($P > 0.05$)。比较这两组各部位的骨密度值,只有女性在华氏三角区部位显示出 Bb 型比 bb 型有较高的 BMD,在其余部位,不管男性还是女性,两组基因型的 BMD 均差异无显著性($P > 0.05$)。结论 VDR 基因多态性与骨密度无相关关系。

【关键词】 维生素 D 受体; 基因多态性; 骨密度

Relationship between bone mineral density and polymorphism of vitamin D receptor gene in Hans in Shanghai MIAO Yingxing, ZHU Hanmin, ZHU Xiaoying, et al. Huadong Hospital/Shanghai Institute of Geriatrics, Shanghai 200040, China

【Abstract】 Objective To investigate the prevalence of polymorphism of the vitamin D receptor (VDR) gene in Chinese people, and study the relationship between bone mineral density (BMD) and polymorphism of VDR gene. Methods The patterns of VDR gene of 348 people in Shanghai were identified by polymerase chain reaction—restriction fragment length polymorphism and BMD of 202 of them were determined by dual-energy X-ray absorptiometry. Results The frequency distribution of genotypes bb, Bb, BB was 0.819, 0.180, 0.0, respectively. The b allelic frequencies reached as high as 0.909. ANOVA Analysis indicated that there was no significant difference in BMD between the two groups of genotypes, with exception of BMD in Ward's triangle. Conclusion There is no significant association of polymorphism in VDR gene with BMD.

【Key words】 Vitamin D receptor; Gene polymorphism; Bone mineral density

1,25-双羟维生素 D_3 [$1,25-(OH)_2D_3$] 是维生素 D 最有活性的代谢物,是人体最重要的钙调节激素之一,它通过特殊的核受体蛋白-维生素 D 受体(VDR)介导而发挥作用。自从 Morrison^[1]发现人类 VDR 基因上等位基因改变是影响骨量的重要遗传因素以来,国内外学者开展了广泛的研究,但结果却不一致,6 年来,争论甚烈,这可能与不同种族人群中 VDR 基因多态性的分布不一致有关,或还处在研究的初期,有待更广泛的积累。本文采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术,调查了我国上海地区人群中 VDR 基因型的分布频率,并对 VDR 基因多态性与骨密度的相关关系作了一个初步分析。

对象和方法

一、对象

选择本院体检或骨质疏松门诊的无亲缘关系的上海地区汉族居民 348 例,男性 201 例,女性 147 例,年龄 40~93 岁。他们均进行了 VDR 基因型的分析,其中有 202 例(女性 104 例,男性 98 例)进行了骨密度(BMD)的测定。

二、方法

1. VDR 等位基因测定

(1)白细胞 DNA 提取:参照 Bass 等^[2]方法,具体如下:取 1 ml 新鲜全血(EDTA 抗凝),加入 3 ml 溶血剂(155 mM NH_4Cl , 10 mM $KHCO_3$, 0.1 mM EDTA),低速离心 20 min,沉淀加入 10% SDS 100 μ l 及 10 μ l 蛋白酶 K(20 mg/ml, Merck 公司),置 56℃ 水浴过夜。

基金项目:上海市卫生局青年基金资助项目(131974Y3)

作者单位:200040 上海市华东医院老年医学研究所

随后,饱和酚、酚:氯仿(1:1)和氯仿各抽提一次,最后水相中加入2倍体积无水乙醇,0.1体积3 MNaAC, -20℃ 20 min,离心后70%乙醇洗涤沉淀,晾干后溶于100 μ l TE中, -20℃保存备用。

(2)引物的设计与合成:参照文献^[3]设计一对引物,由上海生工生物工程有限公司合成。引物1:5' - CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCACTGA - 3';引物2:5' - AACCAGCGGGAAGAGGTCAAGGG - 3'。这两段引物序列分别位于VDR基因第7外显子和第8、9外显子之间的内含子区。

(3)PCR-RFLP法分析VDR基因型:50 μ lPCR反应体系中含Mg²⁺ 1.5 mM, dNTPs800 μ M, 0.5 μ MTaq3U(Promega公司)。反应条件为94℃变性1 min, 52℃退火2 min, 72℃延伸3 min,共需35次循环,最后于72℃再延伸10 min。取10 μ l PCR产物,用2UBsmI酶切4 h(37℃)(Fermentas公司)。PCR产物及酶切产物均1%琼脂糖凝胶电泳,EB染色,紫外灯下观察结果。

2. 骨密度测定:应用双能X线吸收骨密度测定仪(Norland XR-36),测定部位为腰椎L₂₋₄、前后位、腰椎L₅侧位、股骨颈(FN)、大转子(TR)及Ward氏三角(WT)5个部位。

3. 统计分析:采用的统计学方法有t检验, χ^2 检验,以P < 0.05为差异显著。

结 果

1. VDR基因型及等位基因频率的分布

VDR基因BsmI酶切位点多态性确定为:bb型(终产物为650 bp与150 bp)二条带,BB型(终产物只有800 bp一条带),Bb型(终产物有800 bp、650 bp、150 bp三条带)。b表示存在酶切位点,B表示不存在此酶切位点。本研究共测定了348例血样,未见到BB型,只检出了bb型及Bb型两种基因型。VDR基因型、等位基因型、等位基因频率分布见表1。

表1 VDR基因型和等位基因频率分布

性别	例数	VDR基因型		VDR等位基因型	
		bb	Bb	b	B
女	147	121	26	269	26
		(0.832)	(0.177)	(0.912)	(0.088)
男	201	164	37	365	37
		(0.816)	(0.184)	(0.908)	(0.092)
合计	348	285	63	633	63
		(0.819)	(0.181)	(0.909)	(0.091)

注:()内数字为频率

男女性VDR各基因型的分布频率无显著差异($\chi^2 = 0.026, 0.9 > P > 0.75$)。本研究中以bb型多见,b等位基因分布频率高达90.9%,未见到BB型。

表2 女性VDR基因多态性与骨密度的关系

指标	bb型	Bb型	t值
例数	84	20	
年龄	67.23 ± 8.10	63.60 ± 8.19	1.796
IBM	23.25 ± 2.44	24.00 ± 3.33	1.146
L ₂₋₄	0.8055 ± 0.1407	0.8142 ± 0.1822	0.234
L ₅	0.4931 ± 0.1216	0.5173 ± 0.1490	0.428
FN	0.6504 ± 0.1036	0.6953 ± 0.1131	1.708
TR	0.5315 ± 0.0880	0.5736 ± 0.0960	1.884
WT	0.4609 ± 0.1064	0.5181 ± 0.1265	2.081*

注:除例数外,所有的数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示;年龄单位为岁,IBM单位为kg/m²,5个部位骨密度的单位为g/cm²;* P < 0.05

表3 男性VDR基因多态性与骨密度的关系

指标	bb型	Bb型	t值
例数	64	34	
年龄	73.12 ± 7.17	74.44 ± 7.62	0.849
IBM	23.71 ± 3.37	24.25 ± 2.44	0.840
L ₂₋₄	0.9812 ± 0.1802	0.9488 ± 0.1698	0.865
L ₅	0.6932 ± 0.1901	0.6664 ± 0.1326	0.765
FN	0.7221 ± 0.1150	0.7271 ± 0.1178	0.026
TR	0.6632 ± 0.1073	0.6619 ± 0.1196	0.052
WT	0.5112 ± 0.1444	0.5013 ± 0.1180	0.343

注:除例数外,所有的数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示;年龄单位为岁,IBM单位为kg/m²,5个部位骨密度的单位为g/cm²

2. VDR基因多态性与骨密度的关系

两种基因型与骨密度的关系见表2、表3。

由表2、表3可看出,两种基因型组的年龄,IBM均无统计学上的显著差异,P > 0.1,两组有一定的可比性。比较这两组各部位的骨密度值,只有女性在华氏三角区部位显示出Bb型比bb型有较高的BMD(P = 0.040);在其余部位,不管男性还是女性,两组基因型的BMD均无显著差异(P > 0.05)。

讨 论

1992年,Morrison等^[1]根据对高加索人群的研究首次提出了VDR基因多态性与骨钙素相关的概念,之后他们又证实VDR基因多态性与骨密度密切相关,且可占其遗传因素的75%左右^[4]。从此开创了骨质疏松的分子生物学水平的研究,但针对不同

地区人群的研究结果并不一致。

本文检测了 348 例中国汉族男子与妇女,发现以 bb 型多见,占 81.9%,b 等位基因频率为 90.9%,而在高加索人中为 55%,日本人中为 74%^[3],朝鲜人中为 92%^[3]。我国人群中 VDR 基因多态性分布显著不同于高加索人及日本人, $P < 0.01$;与朝鲜人极相似, $P > 0.05$ 。另外,本研究中未见到 BB 基因型,其他亚洲人中 BB 基因型也很少见,而西方人中则占到 10%~20%。

Morrison 等^[4]对高加索人群进行的 VDR 等位基因与 BMD 关系的研究显示 bb 基因型者比 BB 基因型者的 BMD 要高出 15% 左右;在发生椎骨骨折的发病年龄上,bb 型的人可比 BB 型的人晚 10 年左右,因此他们认为 VDR 基因多态性与 BMD 之间存在着较强的相关关系。这之后在美国、法国、瑞典等不同人群中进行的研究又提示 VDR 等位基因与 BMD 之间的关系并不那么明确。在亚洲人中,Tokita 等^[6]对 100 名绝经前健康妇女的研究发现日本人的 BB 基因型仅占 1%,但他们发现了与高加索人相似的 BMD 差异;而 Lim^[3]等对朝鲜人所做的研究中未发现 VDR 基因多态性与 BMD 之间存在相关;另外台湾学者研究结果也认为 VDR 基因多态性与骨密度、骨转换无关^[7]。本文研究亦未发现 BB 基因型,而绝经后妇女中 bb 基因型者在华氏三角区对应较低的骨密度,这与 Morrison 的结论也不同,可能与下列因素有关。

1. VDR 基因型存在种族差异,东方人中 BB 型极少见,样本人数一定要多,最好达到 550 例以上。我们目前又进行了大量研究工作,共达到 835 例,其中 bb 型占 83.2%,Bb 型占 16.8%,这么多例样本中仍未发现 BB 型。它们与骨密度的关系正在研究中。

2. VDR 基因影响 BMD,也许受到了环境因素的调节,如钙摄入量,东方人比西方人要少。而 Dawson-Hughes 等^[8]发现低钙饮食时 BB 基因型者的钙吸收较少。

3. BsmI 酶切点位于 VDR 基因的内含子内,并不影响 VDR 基因的表达产物,但有可能影响基因的转录与翻译水平,是否可能还有待研究。

Ensurd 等^[9]从 1986 年起对 9 704 名老年妇女进行 VDR 基因与骨密度、骨折危险度关系的前瞻性研究,发现无相关,认为 VDR 基因的检测不必作为临床应用手段,目前我国检测例数尚缺乏大规模调研,加上幅员辽阔,可待全面重点调查后,也许才可明确在中国地区的价值。

参 考 文 献

- 1 Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, et al. Contribution of transecting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 6665-6669.
- 2 Bass F, Bikker H, Van Ommen GJB, et al. Unusual scarcity of restriction site polymorphism in the human thyroglobulin gene. A linkage study suggesting autosomal dominance of a defective thyroglobulin allele. *Hum Genet*, 1984, 67: 301-305.
- 3 Lim SK, Park YS, Park JM, et al. Lack of association between vitamin D receptor genotypes and osteoporosis in Koreans. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995, 80: 3677-3681.
- 4 Morrison NA, Chengq J, Tokita A, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature*, 1994, 367: 284-287.
- 5 Yamagata Z, Miyamura T, Lijima S, et al. Vitamin D receptor gene polymorphism and bone mineral density in healthy Japanese women. *Lancet*, 1994, 344: 1027.
- 6 Tokita A, Watanabe T, Miura Y, et al. Vitamin D receptor RFLP and bone mineral density in Japanese. *Bone*, 1995, 16 (Suppl 1): s17-19.
- 7 Tsai KS, Hsu SHJ, Cheng WC, et al. Bone mineral density and bone markers in relation to vitamin D receptor gene polymorphisms in Chinese men and women. *Bone*, 1996, 19: 513-518.
- 8 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: 3657-3661.
- 9 Ensurd KE, Stone K, Cauley JA, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and the risk of fracture in older women. For the study of osteoporotic fractures research group. *J Bone Miner Res*, 1999, 14: 1637-1645.

欢迎参加第八届全国骨质疏松年会暨第五届
全国钙剂年会、第一届全国骨矿研讨会