

绝经后妇女骨质疏松候选基因 ER、IL-6、COL1A1 的研究

刘建民 朱汉民 朱晓颖 戴蒙 江凌 许曼音 陈家伦

【摘要】 目的 骨质疏松是一种多基因疾病,本研究目的是探讨绝经后妇女的雌激素受体(ER)、白介素-6(IL-6)和I型胶原 $\alpha 1$ (COL1A1)基因多态性与骨密度等指标的关系。方法 用DEXA检测205例绝经后妇女的腰椎和股骨颈骨密度,用PCR-RFLP方法检测ER基因PvuII和XbaI多态性和I型胶原 $\alpha 1$ (COL1A1)基因多态性;PCR扩增IL-6基因3'端非翻译区的多态性区域。结果 ER基因PP、Pp和pp基因型频率分别为13.7%、51.2%和35.1%,pp型的绝经后妇女股骨颈骨密度Z值明显高于Pp型。ER基因XX、Xx和xx基因型分别占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。发现了D/D、D/E、C/D、C/C和E/E 5种IL-6基因型,93%以上的绝经后妇女属于D/D和D/E型。在绝经10年以上的妇女中,D/E型的腰椎骨密度明显高于D/D型,且前者的体重指数更高。所有样本的COL1A1基因型检测结果都是无突变的纯合子SS。结论 ER基因型中的pp和XX型可能分别对股骨颈和腰椎有保护作用;IL-6基因多态性与停经时间较长的绝经后妇女腰椎骨密度有一定关系;COL1A1基因型可能不适于评估本地区绝经后妇女骨密度的差异。这些骨质疏松候选基因的意义尚有待在不同种族的人群进行更大样本的研究。

【关键词】 雌激素受体; 白介素-6; COL1A1

Candidate genes of osteoporosis (ER, IL-6, COL1A1) in postmenopausal women LIU Jianmin¹, ZHU Hanmin², ZHU Xiaoying², et al. 1. Department of Endocrinology, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China 2. Department of Geriatrics, Huadong Hospital, Shanghai 200042, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the relationships between ER, IL-6 and COL1A1 gene polymorphisms and bone mineral density (BMD) in postmenopausal women. **Methods** BMD were measured by DEXA at lumbar spine and proximal femur in 205 postmenopausal women. Biochemical markers, such as osteocalcin (BGP) and pyridinoline (Pyd) were also measured. The genotypes of ER and COL1A1 were detected by PCR-RFLP method. The polymorphic 3' flanking region of the IL-6 gene was studied by PCR. **Results** The ER genotyping was as follow: PP (13.7%), Pp (51.2%) and pp (35.1%); the genotype frequencies of XX, Xx and xx were 6.8%, 25.9% and 67.3%, respectively. Individuals with pp genotype of ER gene showed a higher BMD at femoral neck, and women with XX genotype had higher lumbar spine bone mass compared with those with Xx and xx ones, although they had longer period since menopause. D/D, D/E, C/D, C/C and E/E 5 genotypes of IL-6 gene were found; 93% of them were present as D/D and D/E genotypes. Women of D/E genotype with more than 10 years of menopause had a higher BMD at lumbar spine and higher body mass index as compared with D/D ones. All the samples showed normal wild type homozygotes SS of COL1A1 gene. **Conclusion** pp and XX genotype of ER gene may have protective effects on femoral neck and lumbar spine, respectively. IL-6 gene polymorphism has some relationship with BMD in postmenopausal women with longer period of menopause. COL1A1 gene polymorphism cannot be used to assess the bone mass of postmenopausal Chinese women. The significance of these genetic markers of osteoporosis needs to be studied further in larger samples and in different areas.

【Key words】 Estrogen receptor; Interleukin-6; COL1A1

骨质疏松是一种多因素、多基因的疾病,受到遗传、环境、全身激素和局部细胞因子等的多重影响。

低骨量是骨质疏松的主要原因,个体间的遗传差异对决定骨密度和骨量丢失速度具有一定意义。寻找

作者单位:200025 上海,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);上海华东医院老年科(朱汉民、朱晓颖);上海市内分泌研究所(戴蒙、江凌、陈家伦)

与骨密度有关的遗传标记将有助于早期发现低骨量者,开展干预治疗,并阐明骨质疏松的分子遗传发病机制。

雌激素受体(ER)、白介素-6(IL-6)、I型胶原 $\alpha 1$ (COLIA1)基因是骨质疏松的重要候选基因。它们的基因多态性可能与绝经后妇女骨密度和骨丢失速度有关。

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

双能 X 线骨密度仪(DEXA)(Norland, XR-36)测定患者腰椎 L_{2-4} 、股骨颈骨密度。

(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)。

(3)ER 基因 Pvu II 和 Xba I 限制性片断长度多态性分析

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 内含子多态性区域:(上海瑞金医院分子医学中心合成, DNA 热循环仪 480 型:Perkin Elmer)。将 PCR 产物分别与 Pvu II 和 Xba I 内切酶(MBI Fermentas)水浴中温育。将酶解产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶(含 $0.2 \mu\text{g/ml}$ 溴乙锭)电泳。于紫外灯下观察结果,摄影。ER 基因的 RFLP 分别用 P 和 p(Pvu II)及 X 和 x(Xba I)表示,大写字母代表无酶切位点,小写字母代表有酶切位点(以下同)。

(4)IL-6 基因多态性分析

抽提 DNA,PCR 扩增 IL-6 基因 3' 端非翻译区的多态性区域,取 PCR 产物进行 7% 聚丙烯酰胺(29:1)凝胶电泳,以 $0.2 \mu\text{g/ml}$ 溴乙锭染色 30 min,紫外灯下观察结果,并摄影。

(5)COLIA1 基因 Sp1 多态性分析

抽提 DNA,PCR 扩增 COLIA1 基因第 1 内含子 Sp1 结合位点多态性部分。PCR 产物经 Msc I 限制

性内切酶($3\text{U}/\mu\text{l}$)(New England Biolabs)酶切,进行 12% 聚丙烯酰胺(29:1)凝胶电泳,以 $0.2 \mu\text{g/ml}$ 溴乙锭染色 30 min,紫外灯下观察结果,并摄影。

(6)统计

数据以均数 \pm SEM 表示。采用 ANOVA 检验进行组间显著性检验。 $P < 0.05$ 为有统计意义。

结果

1. ER 基因型对骨密度的影响

共有 PP(13.7%)、Pp(51.2%)及 pp(35.1%)和 XX(6.8%)、Xx(25.9%)及 xx(67.3%)各 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、身高、体重和体重指数差异无显著性,但 XX 型妇女的绝经年限(22.0 ± 2.7 年)显著长于 Xx 型(15.0 ± 1.3 年, $P < 0.05$)和 xx 型(15.3 ± 0.8 年, $P < 0.02$)。

PP、Pp 和 pp 型绝经后妇女腰椎 L_{2-4} 的骨密度 Z 值没有区别;股骨颈骨密度 Z 值分别为 -0.19 ± 0.20 、 -0.31 ± 0.08 和 0.03 ± 0.13 , pp 型高于 Pp 型($P < 0.05$)。

XX 型的妇女 L_{2-4} 骨密度 Z 值高于 Xx 型(-0.51 ± 0.53 vs -1.39 ± 0.14 , $P < 0.05$),也高于 xx 型(-0.51 ± 0.53 vs -1.41 ± 0.11 , $P < 0.05$)。三组的股骨颈骨密度没有区别。

血 AKP、BGP 和尿 Pyd/Cr 在 Pvu II 和 Xba I 的各种基因型中没有区别。

2. IL-6 基因型对骨密度的影响

根据电泳条带的位置,发现了 C、D、E 三种等位基因,基因频率分别为 3.97%、86.77% 和 9.26% 共有 D/D、D/E、C/D、C/C 和 E/E 5 种基因型,基因型频率分别为 77.2%、16.4%、2.6%、2.6% 和 1.1%。

在绝经 10 年以上的妇女中,D/E 型的腰椎骨密度明显高于 D/D 型(0.839 ± 0.054 vs 0.759 ± 0.013 g/cm^3 , $P < 0.05$),且前者的体重指数更高(25.4 ± 1.0 vs 22.9 ± 0.3 kg/m^2 , $P < 0.005$),两者的骨生化指标没有差异。

3. COLIA1 基因型对骨密度的影响

所有样本的分析结果均为纯合子野生型基因型 SS,没有检出有突变位点的 Ss 型和 ss 型。

讨论

骨质疏松症是一种有较强遗传背景的多因素疾病。对骨质疏松症候选基因的研究主要集中在调节

钙磷代谢的激素及其受体,如 VitD 受体(VDR)基因和降钙素受体基因;以及雌激素受体(ER)基因;编码细胞因子和骨胶原的基因,如白介素-6 基因、COLIA1 基因等方面进行并取得了一定的进展^[1]。

本研究发现 ER 基因为 pp 型的绝经后妇女股骨颈骨密度高于 Pp 型妇女,国内黄琪仁等^[2]发现凡带 p 等位基因的绝经后妇女,其腰椎和股骨颈等处骨密度较高,而 PP 型妇女的各处骨密度低于 Pp 和 pp 型,尤以股骨大转子部位最为显著。pp 型的意大利绝经后妇女腰椎骨密度略高于 PP 基因型^[3]。PP 基因型的日本绝经后妇女的腰椎和全身骨密度有低于其他基因型的趋势,Z 值从低到高依次见于 PP < Pp < pp 型^[4]。Salmen 等^[5]发现绝经早期妇女的骨量丢失速度也与 ER 基因的 Pvu II 多态性有关,PP 型和 Pp 型妇女腰椎的骨量丢失速度明显快于 pp 型。这些结果提示 ER 基因 pp 基因型可能是一种有益于骨量的基因型。

ER 基因的 Xba I 多态性可能也与骨密度有一定关系。Kobayashi 等发现 Xba I 基因型与腰椎骨密度呈 XX > Xx > xx 的变化趋势^[4],Gennari 等也发现 XX 基因型的妇女的腰椎骨密度略高于 xx 型^[3]。本研究中虽然 XX 型妇女的绝经年限更长,但其腰椎骨密度明显高于 Xx 型和 xx 型。血 AKP、BGP 和尿 Pyd 排出量等生化指标测定结果提示 XX、Xx 和 xx 基因型妇女的骨转换速度可能没有明显差别。在影响骨密度的因素中,除绝经后的骨量丢失速度外,青年时达到的骨量峰值也起着关键作用,较高的峰值骨量有利于延缓骨质疏松症的发生。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较高。Mizunuma 等^[6]对绝经前妇女的腰椎骨密度和 ER 基因多态性的关系进行了研究,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 和/或 Xx 型妇女,但到了围绝经期这一关系就不再存在,提示 Xba I 基因型可能对骨量峰值的取得有一定意义。而我们的结果则提示 ER 基因 Xba I 多态性对骨密度的影响可能会延伸到绝经后,其中以 XX 型对腰椎骨量的维持作用较为明显。当然对此假设还需作进一步的研究。

本研究中绝经后妇女 IL-6 的各基因频率分布与英国 Murray 等^[7]的报道明显不同。在全部样本中我们并没有发现绝经后妇女的腰椎和股骨骨密度与 IL-6 基因多态性的关系,但进一步按绝经年限分

组后发现,绝经 10 年以上的 D/E 型腰椎骨密度明显高于 D/D 型,而且 D/E 型的妇女体重指数明显高于 DD 型,其体重也有升高的趋势,而在停经 5 年和 5~10 年组中没有这种变化。有研究认为男女间体重和身高的差异决定了骨量峰值间的性别差异,且体重对骨峰值的影响较大。中年以后的体重增加可以降低甚至消除因增龄而引起的骨量丢失。但是我们不清楚体重与 IL-6 基因有什么关系,为什么 IL-6 基因型对腰椎骨密度的影响要等到绝经 10 年以后才显现出来。

I 型胶原是体内分布最广、数量最多的胶原成份。COLIA1 是编码 I 型胶原 $\alpha 1(I)$ 链的基因,被看成是调控骨密度的又一候选基因。1996 年英国的 Grant 等报道 COLIA1 基因第 1 内含子上与转录因子 Sp1 结合的位点上有一个 G→T 突变所产生的多态性,可能与骨质疏松有关^[8],1998 年,在荷兰有 1778 名绝经后骨质疏松妇女参加的遗传流行病学调查再次肯定了这一结论^[9]。但是,来自其他一些国家的研究则认为 COLIA1 基因的多态性并不能反映绝经后妇女的骨矿含量或骨丢失速度^[10]。在韩国和国内的类似研究中甚至没能检出一例 Ss 或 ss 个体^[11,12],这也支持了我们的检测结果。

造成这种现象的一个原因可能是人种的遗传背景差异。我们和韩国的相同研究结果提示东方人的 COLIA1 基因多态性可能不同于西方人。该基因的多态性可能不适合作为我国妇女骨质疏松的遗传标记。

总之,ER 基因型中的 pp 和 XX 型可能分别对股骨颈和腰椎有保护作用;IL-6 基因多态性与停经时间较长的绝经后妇女腰椎骨密度有一定关系;COLIA1 基因型可能不适于评估本地区绝经后妇女骨密度的差异。

参 考 文 献

- 1 Eisman JA. Genetics of Osteoporosis. *Endocrine Reviews*, 1999, 20: 788-804.
- 2 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: 38-41.
- 3 Gennari L, Becherini 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.
- 4 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.

(下转第 125 页)

1/10处BMD差异无显著性($P > 0.05$),其余各部位BMD值差异有显著性($P < 0.01 \sim 0.001$)。将各组第3年与第2年测量结果分别进行相比:各组前臂远端1/10处BMD值有显著性增加($P < 0.001$),而前臂远端1/3处和全身总的BMD值,仅超重组有增加($P < 0.05$),其余两组BMD值均无差异,且全身总的BMD值略有下降($P > 0.05$)。各组全身总的BMC值呈逐年上升($P < 0.001$)。

3. 将3年测量得到的身高、体重和前臂远端1/10、1/3及全身总的BMD值进行相关分析,经相关性 t 检验,可见全部受试者身高、体重与前臂远端1/10、1/3及全身总的BMD值均呈直线正相关, $P < 0.001$,相关系数 $r = 0.347 \sim 0.787$ 。全身总的BMD值与前臂远端1/10、1/3处BMD值呈明显直线正相关, $P < 0.001$,相关系数 $r = 0.541 \sim 0.665$ 。

讨 论

女性BMD随年龄的增长,28岁左右有一个小高峰^[5],35岁左右达峰值骨量高峰^[5-7],40岁以后随年龄的增长而逐渐减少,女性骨量明显减少的年龄在49岁左右^[17]。

本文研究显示,该年龄段女孩全身总的BMD值第3次(12岁)测量结果比第2次(11岁)稍低($P > 0.05$),可认为女孩在12岁左右时,BMD出现暂时下降,可能原因是:由于本市女孩月经初潮年龄为13.1岁^[3],故12岁左右女孩多数处于月经初潮前期,发育较快,骨骼面积增大较多,钙的摄入量相对不足,导致了BMD短暂下降。但是,全身总的BMC值总是随年龄的增长而增加($P < 0.001$)。因此,我

们认为,在女孩进入青春期前后,应增加钙的摄入,采取改善营养等干预措施,保证将来能有较高的骨峰值。

研究显示:体重对全身总的BMD值影响较大($r = 0.737 \sim 0.787$, $P < 0.001$):体重越重,全身总的BMD、BMC值越高。该年龄段女孩个体间差异较大,体重最重与最轻者之间相差两倍左右,体重偏轻者全身各部位的BMD值偏低,曾有报道^[3]体重偏轻者其生长发育各项指标明显滞后。各部位的BMD、BMC值均以超重组最高,正常组次之,偏轻组最低,体重对峰值骨量的形成有重要的影响^[2,4]。因此,为了能获得较高的峰值骨量值,减少老年性骨质疏松症及其骨折危险性的发生,在青春期应维持一定的体重。

参 考 文 献

- 1 刘加昌,张瑾,欧阳巧洪,等.600例学龄少女前臂骨密度的研究.中国骨质疏松杂志,2001,7(4):337-338.
- 2 阮祥燕.体重及骨峰值对骨质疏松诊断的影响.当代医学,2000,9:47-51.
- 3 郑皖华,杜学勤,刘忠厚.北京青春期女孩低体重及其对健康影响的研究.中国骨质疏松杂志,2001,7(1):55-57.
- 4 Weiler HA,Janzen L,Green K,et al.Percent body fat and bone mass in healthy Canadian females 10 to 19 years of age. Bone,2000,27(2):203.
- 5 王洪复,朱国英,翁世芳,等.上海市女性峰值骨密度的建立与影响因素探讨.中国骨质疏松杂志,2001,7(4):305-309.
- 6 杨健,倪少凯,苏敏,等.骨密度随增龄变化及其测定影响因素的初步探讨.中华放射学杂志,1998,32(9):639-640.
- 7 刘忠厚主编.骨质疏松学.北京:科学出版社,1998,155-485.