

我国汉族人骨钙素基因多态性和骨质疏松关系的初步研究

张红红 陶国枢 刘建伟 吴青 胡亚卓

【摘要】 目的 骨钙素(OC)基因是骨代谢遗传基础的候选基因之一,本研究旨在探讨 OC 基因多态性的分布规律及与骨质疏松(OP)的相关性。方法 采用银染法聚合酶链反应限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术对 85 例正常对照者和 12 例骨质疏松症的患者 OC 基因进行分型,并计算其基因型频率、等位基因频率。结果 汉族正常对照组 OC 基因 hh, Hh, HH 基因型分别为 61.18%, 35.29%, 3.53%, 等位基因频率 H 型和 h 型分别为 0.2118 和 0.7882, 与骨质疏松组比较无显著性差异。比数比分析,骨密度(BMD)较低的 HH 基因型 OP 的相对危险度是 BMD 较高的 hh 型的 3.47 倍,是 Hh 型的 1.73 倍。结论 就目前调查例数而言,中国汉族人 OC 基因型与骨质疏松无明显相关性,但是,HH 基因型有较高的 OP 发病趋势。

【关键词】 骨钙素; 基因型; 骨质疏松; 聚合酶链反应

Preliminary studies on the relationship between osteocalcin gene polymorphism and osteoporosis in Chinese women ZHANG Honghong, TAO Guoshu, LIU Jianwei. Institute of Gerontological Medicine, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

【Abstract】 Objective Osteocalcin gene(OC) is one of the candidate genes in the molecular-genetic basis of bone metabolism. In this study, the relationship between frequency distribution of OC gene polymorphism and osteoporosis(OP) were investigated. **Methods** The OC genotype was determined in 85 controls and 12 OP patients using PAGE and stained by silver nitrate after polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. **Results** The results showed that the prevalence of the hh, Hh, and HH genotype in the controls was 61.18%, 35.29%, and 3.53%, respectively. Of those patients with osteoporosis accounted for 41.66%, 50% and 8.33% respectively significance. The allele frequencies were 21.18% for H and 78.82% for h. OR analysis showed individuals with genotype HH had a 3.47 times greater risk for OP and those with genotype Hh had 1.73 times greater risk than individual with genotype hh. **Conclusion** The results suggest that no association was found between OC genotype and OP. But HH genotype of OC gene had greater risk trend for OP.

【Key words】 Osteocalcin; Genotype; Osteoporosis; Polymerase chain reaction

骨质疏松(Osteoporosis, OP)是以骨量减低、骨密度下降、伴有骨脆性增加,易骨折为特征。它与许多因素相关,其中遗传因子对 OP 的发生发展有重要作用^[1,2]。

骨钙素(Osteocalcin, OC)是由成骨细胞特异产生的非胶原蛋白,是成骨细胞分化、成熟的标志,也是骨形成或骨转换的重要标志。OC 基因位于 1q25-1q31 处^[3,4],全长 2kb,包含 TATA box、4 个外显子和 1 个启动子区,该启动子区在成骨细胞 OC 基因特异表达的调节中起重要作用。

Dohi^[4]认为 OC 基因多态性与骨量减少呈显著

相关性。OC 基因多态性是由于 OC 基因 5' 端启动子区第 298 碱基胞嘧啶(C)被胸腺嘧啶(T)单碱基替换所致。

自 1994 年以来,许多学者对不同人群、不同地区进行了多项遗传基因,如维生素 D(VDR)基因、雌激素(ER)受体基因、I 型胶原基因(COL1A1)与骨量的研究。但是,结论差异较大,这提示骨量不是由单个基因而是由多个基因调节的。

为寻找其他候选基因,我们采用 PCR-RFLP 技术对中国汉族人的 OC 基因启动子区进行基因多态性分析,以期了解中国汉族人 OC 基因型的分布规律以及与骨量、骨代谢的关系,为筛选 OP 相对高危人群提供理论依据。

基金项目:全军医学科研“十五”计划面上项目(01MA118)
作者单位:100853 北京,解放军总医院老年医学研究所

材料和方法

1. 研究对象

(1)正常对照组 我院体检人员 85 例,其中男性 26 例,女性 59 例;平均 45.78 岁。以上对象均未应用过影响骨代谢的药物。

(2)骨质疏松组 我院门诊患者 12 例,全部为绝经后女性,平均年龄 52.19 岁,双能 X 线吸收仪 (DEXA) 检测腰椎低于骨密度 (BMD) 峰值 2.0 ~ 2.5SD。

2. 研究方法

(1)基因组 DNA 的提取 外周全血经 ACD 抗凝,分离白细胞,饱和酚、氯仿提取。

(2)目的基因片段 PCR 扩增 引物按参考文献设计^[3,4]。序列为 P1, 5'-CCGCAGCTCCCAAC-CACAATAAGCT-3'; P2, 5'-CAATAGGGCGAGGAGT-3'。反应体系为 50 μ l,其中含 10 \times 扩增缓冲液; dNTPs 各 5nmol; 引物 P1、P2 各 25pmol; 模板 DNA 500ng。置热循环仪 (Ericom INC) 中 95 $^{\circ}$ C 预变性 7min,再加 Taq DNA 聚合酶 1.25U。按下列程序循环 30 次,即 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 59 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min,最后于 72 $^{\circ}$ C 再延伸 7min。取产物 5 μ l 经 2% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙啶 (EB) 染色,紫外灯下观察扩增是否成功。

(3)扩增产物的限制性酶切 PCR 扩增产物 5 μ l (约 0.2 μ g) 直接用 5U HindIII 酶切, 37 $^{\circ}$ C, 2 h。

(4)酶切产物分离及结果判定 用 PAGE (12%) 酸性银染法分离及显像酶切产物,以 DNA 片段长度标准物为参考观察结果并照相。OC 基因判定参照文献方法,即缺乏相应酶切位点为 HH 型 (253bp)、Hh 型 (253bp, 232bp, 21bp) 为杂合子、hh 型 (232bp, 21bp) 则代表存在相应酶切位点的基因型。

(5)BMD 测定 双能 X 线吸收仪检测 BMD。

(6)统计学分析 基因频率采用基因计数法计算,基因型频率比较采用似然比 χ^2 检验。用 state 软件进行比数比分析。

结 果

1. PCR 扩增及酶切确定 OC 基因型

基因组 DNA 提取后,经 PCR 扩增,扩增的片段特异性包含 HindIII 多态性位点,长度为 253bp (见图 1),存在 HindIII 多态性位点的纯合子为 hh (232bp),缺乏 HindIII 的纯合子为 HH (253bp),杂合子为 Hh

(253, 232bp)。



1. DNA 片段长度标准物; 2. HH 基因型; 3, 5. hh 基因型; 4. Hh 基因型; 6. PCR 扩增产物

附图 OC 基因 PCR-RFLP PAGE 银染图谱

2. OC 基因多态性分布 对 97 例研究对象,进行 HindIII 限制性内切酶的多态性分析,结果表明,正常对照组和 OP 组无显著性差异 (表 1)。

表 1 中国汉族人 OC 基因型分布

组别	例数	基因型频率		
		HH	Hh	hh
正常对照组	85	3(3.53)	30(35.29)	52(61.18)
骨质疏松组	12	1(8.33)	6(50.00)	5(41.66)
合计	97	4(4.12)	36(37.11)	57(58.76)

3. 比数比 (Odds ratio OR) 分析 与对照组比较,HH 基因型 OP 的相对危险度是 hh 基因型的 3.47 倍,是 Hh 型的 1.73 倍,尽管无显著差异,但是,与 hh 型、Hh 型比较 HH 基因型的 OP 发病有较高趋势。

讨 论

OC 基因启动子区有许多转录调节因子的结合位点,其中包括 VDR 的结合^[5]。有研究显示 VDR 的遗传变异影响着 OC 的生理调节作用,同时,VDR 基因型是绝经期前后女性 BMD 变化的预测因子。因此,遗传因素对骨量、骨代谢的影响日益引起人们的重视。

Dohi 等^[4] 采用 PCR-SSCP 技术研究发现,日本健康人群 OC 基因有突变位点。OC 基因多态性是 5' 端启动子区 C \rightarrow T 的单碱基的改变所产生。

对 160 名日本健康人群的研究发现,在限制性内切酶 HindIII 作用下,hh 基因型 (突变型) 多为高 BMD,HH 型 (正常型) 为低 BMD 且变异较大的趋势,但是,两者间的差异无统计学意义。研究还表明:HH 基因型的妇女骨量减少的危险性是 hh 基因型的 5.74 倍 (OR = 5.74, $P < 0.05$),Hh 基因型的妇女骨量减少的危险性是 hh 型的 1.5 倍,他们认为 OC 基因影响到 BMD。

本研究结果显示,中国汉族健康人和骨质疏松症患者 OC 基因多态性的分布频率均以 hh 基因型为主,分别为 61.18%, 41.66%, 两组间显著性差异

无统计学意义,这与日本的研究结果一致。HH型OP的发病危险性是hh型的3.47倍,Hh型OP的发病危险性是1.73倍,尽管未达到统计学意义,但是有较高的发病趋势(OR = 3.47),说明OC的基因型可能是影响BMD的危险因素。

中国汉族与日本人统属蒙古(Mongoloid)人种,本研究结果与日本人比较(表2),OC基因多态性分布频率非常接近($P > 0.05$),说明种族、饮食、生活习惯对遗传因素的影响可能与同一种族产生相同基因型频率有关。

表2 OC基因型的比较

组别	例数	基因型频率		
		HH	Hh	hh
中国	85	3(3.53)	30(35.29)	52(61.18)
日本	160	12(7.50)	49(30.63)	99(61.88)
合计	245	15(6.12)	79(32.24)	151(61.63)

总之,我们首次初步地研究了中国汉族人OC基因多态性分布规律,发现在正常对照组与OP组间OC基因型无显著性差异,这与日本的研究结果

一致。但是,HH型OP的发病危险性是hh型的3.47倍,Hh型的OP发病危险性是hh型的1.73倍,说明OC基因型可能影响到BMD,这有待于样本的增加、更多方面的分析研究和不同人种的比较来加以证实。

参 考 文 献

- 1 Ralston SH. Do genetic markers aid in risk assessment. *Osteoporosis Int*, 1998, Suppl: S37-S42.
- 2 Raymond MH, Schutte BC, Torner JC, et al. Osteocalcin: Genetic and physical mapping of the human gene BGLP and its potential role in postmenopausal osteoporosis. *Genomics*, 1999, 60: 210-217.
- 3 Celeste AJ, Rosen V, Buecker JL, et al. Isolation of the human gene for bone gla protein utilizing mouse and rat cDNA clones. *EMBO J*, 1986, 5: 1885-1890.
- 4 Dohi Y, Iki M, Ohgushi H, et al. A novel polymorphism in the promoter region for the human osteocalcin gene: The possibility of a correlation with bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *J Bone Miner Res*, 1998, 13: 1633-1639.
- 5 Morrison N, Eisman J. Role of the negative glucocorticoid regulatory element in glucocorticoid repression of the human osteocalcin promoter. *J Bone Miner Res*, 1993, 8: 969-975.

第九届全国骨质疏松年会暨第六届钙剂年会 征文通知

经上级批准,由中国老年学学会骨质疏松委员会、中国骨质疏松杂志社主办的“第九届全国骨质疏松年会暨第六届钙剂年会”(以下简称2003春季会议),定于2003年5月18日~23日在四川省成都市空军招待所召开。届时,中国老年学学会骨质疏松委员会委员、会员,中国骨质疏松杂志的编委,各省、市、区骨质疏松委员会的主要负责同志提前一日(即17日)报到,以便参加18日下午召开的三届二次扩大的工作会议。

2003春季会议征文内容,将重点放于以下12个热点问题:1. 骨质疏松流行病学(骨折、骨质疏松、受体基因、遗传学);2. 骨质疏松发生机理及调控(全身调控及局部调控);3. 男性骨质疏松和继发性骨质疏松诊治;4. 骨矿及骨质量测量、质量控制及测量仪器;5. 骨质疏松诊断标准(DEXA、QCT、超声、RA)及标准化研究;6. 原发性、继发性及男性骨质疏松的生化诊断;7. 骨质疏松治疗原则和方法;8. 骨质疏松治疗药物及进展,HRT的新观点;9. 骨质疏松其它治疗手段;10. 国内外钙剂临床应用的状况及应用机理;11. 中医中药、中西医结合对骨质疏松治疗前景;12. 骨质疏松经济、教育、社区普及等。

本次会议组委会希望:骨质疏松界同仁能够就12个热点问题进行综述和概括,力争作专题报告(30分钟),经与会代表的讨论就一些问题达成共识。

征稿要求:

论文按(题目、作者、单位、邮编、前言、材料方法、结果、讨论、参考文献)格式书写;摘要按[题目、作者、单位、目的、材料方法、结果、讨论、关键词]书写。

来稿请用A4纸打印并需加盖单位公章及第一作者签字后(一式两份)寄出(因会前有关文件只送第一作者),同时请附寄软盘或E-mail发来。会议不接收手抄稿。可获国家一类继续教育学分。

只要报送600字以内摘要的作者,即可得到参会资格。大会组委会设置了“中青年优秀论文奖”(年龄在45岁以下)。一等奖4名,奖金1000元人民币;二等奖10名,奖金600元人民币;并获取大会颁发的证书。参加优秀论文和综述评选的中青年作者,需另报送3200字以内的全文各两份,同时附寄软盘和邮寄审稿费30元。

截稿日期为2003年3月20日(以当地邮戳日期为准)。

会议期间,欢迎厂家、公司参展。有意者来信索取通知。可在网上查取征文及参会通知。

来稿请寄:北京市朝阳区小营路9号亚运豪庭A座05F室

第九届年会组委会 孙继荣 主任收 邮编:100101

联系电话:010-64985881/64936211 传真:010-64936211

E-mail: cgsoc@sina.com/2001@china-osteofound.org

网址: http://www.china-osteofound.org