

广西壮、汉族绝经后妇女维生素 D 受体基因型与骨密度的关系

朱敏嘉 颜晓东 王凤 陈友华 黄忠

【摘要】 目的 探讨维生素 D 受体基因(VDR)型在广西壮、汉族绝经后妇女中的分布及其与骨密度(BMD)的关系。**方法** 在广西居住 20 年以上、无血缘关系的健康绝经后妇女 198 名,其中三代均为壮族的 116 名,均为汉族的 82 名。记录他们的年龄、绝经年龄,测量他们的身高、体重。用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法测定受试者的 VDR 基因型;用双能 X 线吸收法测定髋部、腰椎和前臂的骨密度。**结果** 壮、汉两组妇女 VDR 基因型和 VDR 等位基因频率分布均无显著性差异($P > 0.05$);198 名妇女 BB、Bb、bb 基因型检出率分别为 6.57%、66.16% 和 27.27%;B、b 等位基因分别为 39.65% 和 60.35%。BB 基因型组第二腰椎(L₂)BMD 较 bb 基因型组低 10.03% ($P = 0.047$),第四腰椎(L₄)BMD 分别较 bb、Bb 基因型组低 9.63% ($P = 0.043$) 和 12.44% ($P = 0.005$)。BB 基因型组骨质疏松发生率最高(46.15%),Bb 基因型组次之(19.86%),bb 基因型组最低(14.81%),差异有显著性($P = 0.04$)。**结论** VDR 基因型与广西壮、汉族绝经后妇女 BMD 有关联,BB 基因型可能可作为预测广西壮、汉族绝经后妇女骨质疏松危险性的遗传学标志之一。

【关键词】 维生素 D 受体; 基因型; 骨密度

Relationship between vitamin D receptor genotypes and bone mineral density in Guangxi Zhuang and Han nationality postmenopausal women ZHU Minjia, YAN Xiaodong, WANG Feng, et al. Research Institute of Geriatrics, Guangxi Zhuang Autonomous People's Hospital, Nanning 530021 China

【Abstract】 Objective To investigate the distribution of vitamin D receptor(VDR) genotypes and the association of VDR genotypes with bone mineral density(BMD) in Guangxi Zhuang and Han nationality postmenopausal women. **Methods** 198 postmenopausal women who have resided in Guangxi over 20 years, and their grandparents and maternal grandparents were of the same nationalities were included in this study. Their age, age at natural menopause height, and weight were recorded. Their VDR genotypes were idetermined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) using the Bsm I enzyme; their BMD was determined by dual energy X-ray absorptiometry (DEXA) at proximal femur, lumbar vertebrae (L₂ ~ L₄) and radius. **Results** The distribution of the VDR genotypes did not differ significantly between Zhuang and Han nationalities ($P > 0.05$). Within the tested samples, there were 6.57% BB homozygotes, 66.16% Bb heterozygotes, and 27.27% bb homozygotes. The BMD of L₂ in the BB group was 10.03% lower than that in bb group ($P = 0.047$); the BMD of L₄ in the BB group was 9.63% and 12.44% lower than those in bb and Bb group, respectively ($P = 0.043$ and $P = 0.005$, respectively). The osteoporosis prevalence rates in BB, Bb and bb women were 46.15%, 19.85% and 14.81%, respectively, with a significant difference ($P = 0.04$). **Conclusion** VDR genotypes are associated with vertebral BMD and osteoporosis in Guangxi Zhuang and Han nationality postmenopausal women, and BB genotype may serve as a hereditary predirector of osteoporosis in them.

【Key words】 Vitamin D receptor; Genotype; Bone mineral density

基金项目:广西壮族自治区科技厅科研基金资助项目(9920019)

作者单位:530021 南宁,广西壮族自治区人民医院老年病研究

所

骨质疏松症是严重影响中老年妇女健康疾病之一,其发病机制尚未完全清楚,自 1994 年 Morrison 等^[1]首先报道维生素 D 受体(VDR)等位基因与骨密度有关以来,种族和遗传与骨密度的关系受到广泛

的关注。然而,各国、各地区研究结果不尽一致。壮族是全国人口最多的少数民族,尚未有有关壮族和广西汉族人群 VDR 受体基因型分布及其与骨密度关系的研究报道。为此,本研究选择广西壮、汉族绝经后妇女为研究对象,旨在探讨广西壮、汉族女性 VDR 基因型分布特点及其与 BMD 的关系。

材料和方法

1. 研究对象

选择在广西居住 20 年以上、三代均为壮族或汉族、自然绝经 1 年以上、身体健康、无血缘关系、无影响骨代谢的内分泌代谢疾病及妇科疾病,无连续(3 个月以上)服用影响骨代谢药物,心、肺、肝、肾功能正常的妇女 198 例。其中汉族妇女 116 例,年龄 38 ~ 70(57.69 ± 4.27)岁;体重指数(BMI)18.66 ~ 29.43(23.48 ± 2.42)kg/m²;体重 46 ~ 70(55.67 ± 6.43)kg;绝经年限 1 ~ 22(8.29 ± 5.32)年。壮族妇女 82 例,年龄 39 ~ 78(56.61 ± 7.28)岁;体重指数(BMI)18.26 ~ 29.14(23.73 ± 2.66)kg/m²;体重 40 ~ 70(55.20 ± 6.51)kg;绝经年限 1 ~ 25(8.39 ± 6.24)年。壮、汉两组年龄、BMI、体重、绝经年限比较差异均无显著性($P > 0.05$)。

2. 方法

(1)骨密度测量:采用双能 X 线吸收方法(法国 DMS 公司 Challenger 型)测股骨近端及腰椎 2 ~ 4(L₂ ~ L₄)后前位和桡骨的 BMD 值,单位为 g/cm²,BMD 值低于正常年轻妇女 BMD 平均峰值减去 2.5 个标准差诊断为骨质疏松症^[2]。

(2)维生素 D 受体基因型检测

白细胞 DNA 提取:外周静脉血 5 ml,2% EDTA 抗凝,经盐析法提取基因组 DNA。

聚合酶链反应限制性片断长度多态性(PCR-RFLP)方法分析 VDR 基因型:引物 5'-CTGCCACCC-TATCTGTATCTTTTCCTATTCTTC-3'; 5'-GCAACTCCT-CATGGCTGAGGTCTC-3'。PCR 扩增反应体系为 30 μl,其中模板 DNA 3 μl,5 × PCR 缓冲液 6 μl,2 mm dNTP₃ 6 μl,引物 P₁、P₂ 各 1 μl,Taq 酶 1.5 μl(1U),水 11.5 μl。程序如下:93℃预变性 3 min,加 Taq 酶 1U 后,93℃变性 40 s,55℃退火 55 s,72℃延伸 50 s,共 33 个循环,循环完成后于 72℃再延伸 5 min。PCR 产物经 BsmI 酶切后,置 2% 琼脂糖凝胶电泳确定 3 种基因型,存在 BsmI 酶切位点的纯合子(bb)显示 750 bp 和 250 bp 两条带;缺乏 BsmI 酶切位点的纯合子(BB)显示 900 bp 一条带;杂合子(Bb)则显示上述三

条带。

(3)设备和试剂:中山大学达安基因股份有限公司的达安离心机、DNA 提取试剂盒和 Taq 酶,大连宝生物工程公司提供 BsmI 限制性内切酶,凝胶成像设备为德国 UVP 型,引物由上海博亚生物公司合成(由中山大学达安基因股份有限公司协助完成)。

3. 统计学处理

采用 SPSS10.0 软件。采用的统计学方法有 χ^2 检验 One-Way ANOVA 的 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 广西壮、汉族绝经后妇女的 VDR 基因型和等位频率分布(见表 1)

表 1 广西壮、汉族绝经后妇女 VDR 基因型和等位基因型频率分布

组别	例数	VDR 基因型			VDR 等位基因型	
		BB	Bb	bb	B	b
汉族	116	7(0.060)	71(0.612)	38(0.328)	85(0.366)	147(0.634)
壮族	82	6(0.073)	60(0.732)	16(0.195)	72(0.439)	92(0.561)
合计	198	13(0.066)	131(0.661)	54(0.273)	157(0.396)	239(0.604)

注:()内数字为频率

壮、汉族绝经后妇女 VDR 各基因型的分布频率差异无显著性($\chi^2 = 4.250, P = 0.119$),壮、汉族绝经后妇女 VDR 等位基因型的分布频率差异也无显著性($\chi^2 = 2.119, P = 0.145$)。本组资料以 Bb 基因型多见,占 66.16%,bb 型次之,占 27.27%,BB 型最少,仅 6.57%。b 等位基因分布频率为 60.35%,B 等位基因分布频率为 39.65%。

2. 广西壮、汉族绝经后妇女 VDR 基因型与骨密度的关系(见表 2)

表 2 广西壮、汉族绝经后妇女 VDR 基因型与 BMD 的关系($\bar{x} \pm s$)

项目	bb 型	Bb 型	BB 型
	(n = 54)	(n = 131)	(n = 13)
年龄(岁)	56.81 ± 4.99	57.29 ± 6.11	58.54 ± 4.43
绝经年限(年)	7.46 ± 5.51	8.61 ± 5.87	9.00 ± 4.38
BMI(kg/m ²)	23.90 ± 2.72	23.48 ± 2.46	23.29 ± 2.35
BMD(g/cm ²)			
股骨颈	0.810 ± 0.104	0.808 ± 0.085	0.769 ± 0.099
Ward's 三角	0.634 ± 0.137	0.635 ± 0.122	0.572 ± 0.114
大转子区	0.725 ± 0.110	0.719 ± 0.087	0.670 ± 0.071
L ₂	0.738 ± 0.086	0.724 ± 0.128	0.664 ± 0.144 [*]
L ₃	0.792 ± 0.090	0.788 ± 0.133	0.726 ± 0.148
L ₄	0.779 ± 0.078	0.804 ± 0.129	0.704 ± 0.160 ^{*Δ}
前臂超远端	0.328 ± 0.062	0.343 ± 0.058	0.335 ± 0.067
前臂远端	0.454 ± 0.085	0.452 ± 0.089	0.454 ± 0.081

注:用 LSD 法进行两两比较,与 bb 型组比较^{*} $P < 0.05$;与 Bb 基因型组比较^Δ $P < 0.01$

3 种基因型的年龄、绝经年限、BMI 均无统计学差异。BB 基因型组妇女 L_2 的 BMD 较 bb 基因型组妇女低 10.03%, L_4 的 BMD 分别较 Bb、bb 基因型组妇女低 12.44% 和 9.63%, 差异均有显著性 ($P < 0.05$)。3 组妇女在其余检测部位的 BMD 差异无显著性 ($P > 0.05$)。

3. 广西壮、汉族绝经后妇女 VDR 基因型与骨质疏松的关系(见表 3)

表 3 广西壮、汉族绝经后妇女骨质疏松与非骨质疏松组 VDR 基因型频率分布(%)

VDR 基因型	例数	组别	
		骨质疏松	非骨质疏松
BB	13	6(46.15)	7(53.85)
Bb	131	26(19.85)	105(80.15)
bb	54	8(14.81)	46(85.19)

注: χ^2 检验显示, 两组间差异有显著性 ($\chi^2 = 6.414, P = 0.04$)

BB 基因型组妇女骨质疏松发生率最高 (46.15%), bb 基因型组次之 (19.85%), bb 基因型组最低 (14.81%), 差异有显著性 ($P = 0.04$)。

讨 论

大多数报道认为, VDR 基因型频率分布存在种族差异性。有报道白种人中 BB、Bb、bb 基因型分别占 15.4% ~ 18.6%、47.4% ~ 57.8% 和 23.6% ~ 37.2%^[3-6]。亚洲人 VDR 基因型频率分布明显不同于白种人, 中国沈阳、上海和北京报道 BB、Bb、bb 基因型频率分别为 0%、6% ~ 18.1% 和 81.9% ~ 94%^[7-9], 中国台湾、韩国和日本分别是 0.4% ~ 1.4%、6.7% ~ 19.3% 和 79.6% ~ 93%^[10-12], 中国广州是 7.6%、45.1% 和 47.2%^[13]。本组 198 名妇女中, BB、Bb、bb 基因型所占比例分别为 6.57%、66.16% 和 27.27%, 与广州张清学报道与白种人相近, 但与国内其他地区和日、韩两国报道相差甚远。本资料还显示, 广西壮族和汉族妇女的 VDR 基因型和 VDR 等位基因分布频率差异无显著性。

骨密度也存在种族差异性。一般认为美国黑人 BMD 最高, 亚洲人最低, 白种人介于两者之间^[14], 而这种人种间 BMD 的差异性与遗传因素有关。Morrison 等^[1]报道, VDR 基因型与骨代谢和骨质疏松密切相关。他们在对白种人的 VDR 等位基因与 BMD 关系的研究显示, bb 基因型者的 BMD 比 BB 基因型者高 15%, 并认为这种 BMD 的差异可理解为, 在椎体骨折的发病年龄上, bb 基因型者比 BB 基因型者晚 10 年左右^[1]。Marc 等对 102 例绝经后南斯拉夫妇女

研究结果也表明, BB 基因与低 BMD 显著相关^[5]。但法国、比利时等国的相关研究未发现 VDR 基因多态性与 BMD 有明显的相关性^[4,6]。在亚洲人中, Tokita 等^[14]对 100 名绝经前健康妇女的研究发现, 虽然日本人 VDR 基因型分布与白种人明显不同, 但不同基因型间仍有类似于白种人的 BMD 差异, BB 基因型妇女的 BMD 较 bb 基因型妇女低 9.3%。赵金秀等^[15]对北京汉族 106 例绝经后妇女的研究发现, Bb 基因型者比 bb 基因型骨密度低。而韩国、台湾、广州、上海的学者研究结果认为 VDR 基因多态性与 BMD 无关。本组资料显示, 广西壮、汉族绝经后妇女 VDR 基因型与腰椎 BMD 和骨质疏松的发生率相关, bb 基因型者第二、第四腰椎的 BMD 较 BB 基因型者高 9% ~ 10%; Bb 基因型者第四腰椎的 BMD 较 BB 基因型者高 12.44%; BB 基因型者骨质疏松发生率明显高于 Bb、bb 基因型者。因此, BB 基因型可能可作为预测广西壮、汉族绝经后妇女骨质疏松危险性的遗传学标志之一。

我们的研究结果与亚洲和国内许多地区不同, 推测可能与下列因素有关: ①本组资料的 BB 基因型检出率较亚洲和国内其他地区高, 且以 Bb 基因型为主, 而 bb 基因型检出率明显低于亚洲和国内其他地区。②本研究样本量不够大, 骨质疏松例数较少。如能进一步扩大样本数, 注意在骨质疏松人群中检测 VDR 基因型, 可能会使研究结果更加客观。

参 考 文 献

- Morrison NA, Chengqi J, Tokita A, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature*, 1994, 367: 284-287.
- Kanis J, Melton I, Christiansen C, et al. The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Mineral Res*, 1994, 9: 1137-1141.
- Beavan S, Prentice A, Yan L, et al. Difference in vitamin D receptor genotype and geographical variation in osteoporosis. *Lancet*, 1996, 348(13): 136.
- Garnero P, Borel O, Sornay-Rendu E, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms do not predict bone turnover and bone mass in healthy premenopausal women. *J Bone Mineral Res*, 1995, 10: 1283-1288.
- Marc J, Preze J, Komel R, et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphism with bone mineral density in Slovenian postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol*, 2000, 14(1): 60-64.
- Vanduyver C, Wylin T, Cassiman JJ, et al. Influence of the vitamin D receptor gene alleles on bone mineral density in postmenopausal and osteoporotic women. *J Bone Miner Res*, 1997, 12: 241-247.
- 闫丽媛, 王晓红, 张卉, 等. VDR 受体基因型分布及其与骨矿含量的关系. *中国骨质疏松杂志*, 1997, 3(2): 19.

(下转第 137 页)

成。

Tsukahara 等^[6]发现,长期应用 NOS 的抑制剂氨基胍可以引起骨吸收和骨形成的平衡失调,导致骨量减少,同样在 PMO 的动物模型中,也显示了破骨细胞的吸收活性被 NOS 的抑制增强。提示在体内,NOS 抑制剂经增强破骨细胞骨吸收而改变骨代谢的活动。

近年来的研究表明,OB 也可产生 NO。IL-1 β , TNF- α , IFN- γ 等因子通过 NO 浓度影响 OC 性骨吸收作用的主要靶细胞为 OB,OB 在各种细胞因子的作用下合成释放 NO 有助于 OC 活性的调节。借助改变 OB 内的 NO 水平是 IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β 等因子作用的主要方式之一^[7]。

低水平 NO 导致细胞因子诱导性骨吸收增强与绝经后雌激素缺乏妇女骨质疏松密切相关。本实验中大鼠去势后,雌激素降低,NO 和 NOS 水平低下的结果充分证明了这一结论。

现已公认,雌激素缺乏是 PMO 的主要原因,其机理尚未完全阐明。但已知雌激素通过多种途径参与骨代谢,实验发现雌激素可以促进内源性 NO 的产生^[8,9]。妇女在绝经后,由于缺乏雌激素的控制,使得在骨组织中调节骨代谢的细胞因子变得紊乱, TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 、LPS 等活性受到抑制, IL-4、IL-10、TGF- β 等活性增强,这些因子调节着 NO 和 NOS 的水平,NOS 抑制,导致 NO 合成和释放减少,从而促进了骨质疏松的病理生理过程。Armour 等^[10]的体外实验表示,17 β -雌二醇(E₂)在人成骨细胞培养中促进 cNOS mRNA 的产生和 cNOS 的活性,从而提高 NO 水平,揭示 cNOS 途径是关于雌激素在骨作用的一个重要指标,NO 可防治雌激素减少所致的骨量丢失,具有类似雌激素替代疗法的作用,雌激素对骨量的维持作用是通过 NO 调节的。从而提示,外源性给予 NO 在预防雌激素缺乏所导致的骨丢失方面有

一定治疗价值。

研究 NO 和 NOS 在骨质疏松的病理过程中的作用机制具有重要的临床意义。一方面提高 NOS 活性,可以提高 NO 的水平,从而起到抑制 OC 骨吸收的作用,另一方面由于 NO 对骨细胞的已知作用,可以应用 NO 供体药物达到治疗骨质疏松的目的。如何保持 NO 在一适当的浓度水平,在骨质疏松的防治中将具有重要意义,而此方面的研究也必然为临床上的绝经后骨质疏松症的预防和治疗开辟一条新的途径。

参 考 文 献

- 1 Van TH, Ralston SH. Nitric oxide and bone. *Immunology*, 2001, 103: 255-261.
- 2 Gurkan L. Bone change after castration in rats; a model for osteoporosis. *Acta Orthop Scand*, 1986, 57: 67.
- 3 Miep H, Helfrich, Deborah, et al. Expression of nitric oxide synthase isoformas in bone and bone cell cultures. *J Bone Miner Res*, 1997, 12: 1108-1112.
- 4 Robert J, De Marco G, Gangula P, et al. Cytokine induced Nitric oxide inhibits bone resorption by inducing apoptosis of osteoclast progenitors and suppressing osteoclast activity. *J Bone Miner Res*, 1997, 12: 1797-1801.
- 5 Ralston SH. The Michael Mason Prize Essay 1997, Nitric oxide and bone: what a gas. *Br J Rheumatol*, 1997, 36: 831-838.
- 6 Tsukahara H, Miura M, Tsuchida S, et al. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on bone metabolism in growing rats. *Am J Physiol*, 1996, 270: E840.
- 7 Damoulis PD, Hauschka PV. Nitric oxide acts in conjunction with proinflammatory cytokines to promote cell death in osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 1997, 12: 412-422.
- 8 Berthezene F. Hormone replacement therapy at menopause in the diabetic woman. *Diabetes Metab*, 2001, 27: S83-S86.
- 9 李昂,萧劲夫,薛延. 骨质疏松的一氧化氮机制研究. 国外医学老年医学分册, 2001, 22: 33-37.
- 10 Armour KE, Ralston SH. Estrogen upregulates endothelial constitutive nitric oxide synthase expression in human osteoblast-like cells. *Endocrinology*, 1998, 139: 799. (收稿日期: 2003-09-01)
- 12 Kikuchi R, Uemura T, Gorai I, et al. Early and late postmenopausal bone loss is associated Bsm1 vitamin D receptor gene polymorphism in Japanese women. *Calcif Tissue Int*, 1999, 64: 102-106.
- 13 张清学,王文军,邝健全,等. 维生素 D 受体基因多态性与绝经前后妇女的骨密度. 中山医科大学报, 2000, 21: 376-379.
- 14 Finkelstein JS, Lee MT, Sowers MF, et al. Ethnic variation in bone density in premenopausal and early perimenopausal women: effects of anthropometric and lifestyle factors. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87: 3057-3067.
- 15 赵金秀,周学瀛,孟迅吾,等. 中国妇女维生素 D 受体基因型与骨密度及骨钙素关系的研究. 中国医学科学院学报, 1997, 19: 252-256. (收稿日期: 2003-09-01)

(上接第 142 页)

- 8 缪应新,朱汉民,朱晓颖,等. 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. 中国骨质疏松杂志, 2002, 8: 20-22.
- 9 张红红,柳川,刘建伟,等. 聚合酶链反应限制性片段长度多态性检测维生素 D 受体基因型. 中华医学检验杂志, 1998, 21: 145-147.
- 10 Tsai KS, Hsu SHJ, Cheng WC, et al. Bone mineral density and gene markers in relation to vitamin D receptor gene polymorphisms in Chinese men and women. *Bone*, 1996, 19: 513-518.
- 11 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: 3667-3681.