

糖皮质激素受体基因多态性与骨密度关系的研究

赖滨 丁国宪 蔡金梅 刘娟 程蕴琳

【摘要】 目的 以体内糖皮质激素水平正常的人群为研究对象,研究糖皮质激素受体(GR)基因多态性与骨密度间的关系。方法 用特异的等位基因 PCR 方法检测人群的 GR 基因型,用 DEXA 检测腰椎、股骨各处骨密度。结果 在男性病例,各基因型间 BMD 的 T 值无明显统计学差异;在女性病例,各基因型间 BMD 的 T 值比例:TT 型比 CC 型 T 值明显升高($P < 0.05$)。结论 GR 基因外显子 8 的 678 位点突变(C→T),可使女性腰椎骨密度增加,具有骨密度保护作用。

【关键词】 糖皮质激素;受体;多态性;骨密度

Association of polymorphism in the glucocorticoid receptor gene and bone mineral density LAI Bin, DING Guoxian, CAI Jinmei, et al. Department of Geriatric, The first affiliated Hospital of Nanjing Medical University, nanjing 210029, China

【Abstract】 Objective To research the relationship between a polymorphism in the glucocorticoid receptor (GR) gene and bone mineral density (BMD) in the subjective with normal glucocorticoid level. **Methods** The genotype of GR gene were detected by allele-specific PCR method, and BMD were measured at lumbar-spine and proximal femoral by DEXA. **Results** In the male, there was no significance in T value of BMD between CC, CT and TT genotypes. In the female with TT genotype, the T value in lumbar spine BMD was higher compared with CC genotype. **Conclusion** This result indicated that the TT genotypes of code 678 in exon 8 of glucocorticoid receptor gene have some protective on lumbar spine bone mass.

【Key words】 Glucocorticoid; Receptor; Polymorphism; Bone mineral density

原发性骨质疏松症受到遗传、环境的共同作用,是多基因相互影响共同作用的结果,近年来,在对双胞胎及家庭性的研究表明:遗传因素显著影响骨矿密度(BMD)。原发性骨质疏松症的发病 80% 与遗传因素有关,环境因素占 20%^[1-3]。

临床研究早已发现糖皮质激素增多引起的 Cushing's 综合症常伴骨质疏松,长期使用大剂量糖皮质激素也可诱发骨质疏松。近来国外对体内糖皮质激素水平正常的人群研究发现,在 GR 基因的 363 密码子上天冬氨酸—丝氨酸改变(N363S 携带者)者腰椎 BMD 的 T 值和对照者相比有降低趋势(-0.48 vs, 0.02, $P = 0.08$),糖皮质激素受体(GR)的基因多态性可能与 BMD 改变有关。糖皮质激素水平正常的人,由于其 GR 基因的异常,可能造成糖皮质激素作用改变,而会发生骨矿密度(BMD)降低、骨质疏

松^[4,5]。

本研究以体内糖皮质激素水平正常的人群为研究对象,通过 PCR 技术检测中国人群的 GR 基因型,并进行骨密度测定,探讨 GR 基因多态性与 BMD 的关系,以进一步明确骨质疏松症的病因、发病机制,为早期发现易感人群、及时干预提供理论依据。

材料和方法

1. 研究对象

选自我院门诊及住院病例 191 例,其中男性 91 例,年龄 60~75 岁,女性 100 例,年龄 55~70 岁。并且通过体检、肝功能、肾功能、血钙、血磷、血皮质醇等检查排除继发性骨质疏松、严重肝脏疾病、肾脏疾病和皮质醇增多症。

2. 方法

(1)临床及生化指标的检测:所有研究对象均测量身高、体重、腰围、臀围,计算体重指数(BMI)和腰

臀比(WHR)。清晨空腹抽血 5 ml,静置,离心后提取上层清液,查血钙、碱性磷酸酶、尿素氮、肌酐、谷丙转氨酶、谷草转氨酶、血葡萄糖,生化测定用全自动生化分析仪。

(2)骨矿密度(BMD)检测:采用双能 X 线 BMD 测定(美国 Lunar 公司 DEXA 检测仪)。所有研究对象均采取仰卧位测前后位腰椎(L₂-L₄)及左侧股骨颈、髁骨的 BMD。T 值为测量的 BMD 减同性别峰值 BMD 之差比峰值 BMD 标准差。

(3)GR 基因外显子 8 基因变异分析^[6]:

DNA 抽提:用酚-氯仿法抽提。

PCR 引物:由于在 GR 基因外显子 8 密码子 678 位点突变;C→T,通过特异的等位基因引物分别进行二次 PCR 扩增,根据是否出现 DNA 条带判断是 C 或 T。

初次 PCR 引物:上游引物:5'-GTAGTGCATT-TAAAACAAAACAAC-3',下游引物:5'-TCCTTAACT-GACTTCATCTTAACC-3

C 等位基因引物:共同上游引物:5'-ATTG-GCTTTATGTTTGACACTTAC-3',下游引物:5'-TCT-TAACCTTTTAGTTCCTAAGGAC-3'

T 等位基因引物:共同上游引物:5'-ATTG-GCTTTATGTTTGACACTTAC-3',下游引物:5'-TCT-TAACCTTTTAGTTCCTAAGGAT-3'

初次 PCR 扩增(PCR 产物 1009bp):取 DNA 0.5 μg,初次 PCR 引物各 0.1 μl,2 mmol/L MgCl₂,50 mmol/L KCl,Tris-Cl (pH8.4),0.2 mmol/L dNTP,1U Taq,总体积 25 μl,PCR 反应条件:94℃ 5 min,94℃ 25 s、60℃ 40 s、72℃ 80 s,35 个循环,72℃ 10 min。

特异等位基因 PCR 扩增(PCR 产物 197bp):取初次 PCR 产物 1 μl,PCR 引物各 0.1 μl,2 mmol/L Mg-Cl₂,50 mmol/L KCl,Tris-Cl (pH8.4),0.2 mmol/L dNTP,1U Taq,总体积 25 μl,PCR 反应条件:94℃ 5 min,94℃ 30 s、58℃ 30 s、72℃ 30 s,30 个循环,72℃ 5 min。

(4)电泳:取 PCR 产物 10 μl 加样于 2% 琼脂糖凝胶电泳,电压 110V,时间 30 min。在紫外分析仪下,根据有无条带,判断结果。

(5)统计学处理:以均数 ± 标准差表示,采用 t 检验。

结 果

1. GR 基因多态性在研究对象分布特点

191 例研究对象 GR 基因基因型:TT 型 23 例(男

10 例,女 13 例),CT 型 43 例,(男 23 例,女 20 例),CC 型 125 例(男 58 例,女 67 例)。

2. 不同基因型间临床特点

男、女组 CC 型、CT 型、TT 型三者间在年龄、BMI、WHR、血糖(空腹及餐后血糖)比较都无明显差异,见表 1、2。

表 1 男性各基因型一般临床资料

Table with 4 columns: 项目, TT, CT, CC. Rows include 年龄, BMI, WHR, FBS, PBS with mean values and standard deviations.

表 2 女性各基因型一般临床资料

Table with 4 columns: 项目, TT, CT, CC. Rows include 年龄, BMI, WHE, FBS, PBS with mean values and standard deviations.

3. 不同基因型间 BMD 比较

在男性病例,各基因型间 BMD 的 T 值比较无明显统计学差异,见表 3。在女性病例,各基因型间 BMD 的 T 值比较:TT 型比 CC 型 T 值明显升高(P < 0.05),其它组间比较虽无统计学差异,但股骨颈、Ward's 区、Troch 区 T 值及总 BMD 的 T 在 CC 型、CT 型、TT 型三组的 T 值都有逐渐增设趋势,见表 4。

表 3 男性各基因型骨密度 T 值

Table with 4 columns: 部位, TT, CT, CC. Rows include L2-4, Neck, Ward's, Troch, 合计 with T values.

表 4 女性各基因型骨密度 T 值

Table with 4 columns: 部位, TT, CT, CC. Rows include L2-4, Neck, Wards, Troch, 合计 with T values.

注:与 CC 型比较 * P < 0.05

讨 论

糖皮质激素以多种形式影响钙磷代谢和骨代谢,糖皮质激素不但可使肠道对钙的吸收降低、肾脏

钙和磷的重吸收减少,而且使甲状旁腺激素合成和敏感性增加、降钙素分泌减少、性激素水平降低。同时,糖皮质激素对骨还有直接作用,可使骨生长因子如 IGF、TGF 降低,破骨细胞数量和活性增加,成骨细胞功能抑制,骨密度下降;糖皮质激素还抑制骨基质的合成、降低骨修复能力,使骨质量降低,易造成骨折^[7,8]。

目前,国外研究发现:糖皮质激素对机体的作用,除了与其血浆水平增高有关外,很大程度上还与其在局部组织的活化作用以及使其再生的关键酶的作用、细胞内糖皮质激素受体活性有关^[9]。

局部组织存在着调节糖皮质激素代谢作用的关键酶:11 β -羟化类固醇脱氢酶(11 β -HSD)。11 β -HSD 能够促进氢化可的松和可的松之间的相互转化,11 β -HSD₁ 作为还原酶,将无生物活性的可的松转化为有活性的氢化可的松。因而 11 β -HSD₁ 酶活性增强可增加局部组织的糖皮质激素水平,而使糖皮质激素作用增加^[9]。

糖皮质激素最终须通过与其细胞内受体(GR)结合而发挥作用。因而糖皮质激素受体的基因变异造成的蛋白结构异常或基因表达改变,将影响受体的数量和结合力,从而影响糖皮质激素的作用。人类的 GR 首先是由 Hollenberg 等人克隆和作出序列的。体外的成骨细胞中 GR 比雌激素受体(ER)、维生素 D 受体(VDR)有更高的表达。近来研究发现在人类骨骼发育和成熟的各个阶段,功能性的 GR 存在于成骨细胞^[8]。

国外报道已发现 GR 的基因多态性与 BMD 改变有关。研究发现对 N363S 携带者使用 0.25 mg 超小剂量地塞米松(DEX)抑制试验,可显示体内氢化可的松的水平明显抑制,血浆胰岛素水平轻度升高,因而具有 GR 基因的 363 密码子上天冬氨酸—丝氨酸改变(N363S 携带者)会导致 GR 对糖皮质激素的敏感性升高^[4]。

我们对 GR 基因外显子 8 研究发现,在男性人群,CC、CT、TT 三种基因型间骨密度无明显异常;而在女性人群,TT 基因型者 L₂₋₄ 骨密度明显升高,而其它部位骨密度也有升高趋势,且 CC、CT、TT 基因型逐步升高。因而本研究提示:男女骨质疏松症存在不同的遗传基础和病因、发病机制,男性骨质疏松症和糖皮质激素受体外显子 8 基因变异无明显关系,而女性骨密度和糖皮质激素受体基因外显子 8 基因

变异有关,糖皮质激素受体外显子 8 的 678 位点突变(C→T)可使骨密度增加,具有骨密度保护作用,这与国外报道的 GR 基因外显子 2 上 363 密码子天冬氨酸—丝氨酸改变者(N363S 携带者)腰椎 BMD 的 T 值和对照组相比有降低趋势^[4]恰恰相反。

国外研究也证实,不同的 GR 基因变异可形成不同的糖皮质激素敏感性,导致不同的表现型。如外显子 2 上 22、23 密码子单个核苷酸突变(ER22/23EK)可造成糖皮质激素抵抗,男性 ER22/23K 携带者身材较高、肌肉更多、更强壮,而女性 ER22/23EK 携带者腰臀比较小、体重较轻;外显子 2 N363S 携带者则糖皮质激素敏感性增加,体脂增加、胆固醇水平增加、胰岛素分泌增加;而外显子 2 下游内含子 C→G 的点突变不引起糖皮质激素敏感性变化^[10]。

本研究证实 GR 基因外显子 8 糖皮质激素受体外显子 8 的 678 位点突变(C→T)可使女性腰椎骨密度增加,具有骨密度保护作用。

参 考 文 献

- 1 Audi L, Garcia-Ramirez M, Carrascosa A. Genetic determinants of bone mass. *Horm Res*, 1999,51(3):105-123.
- 2 Baudoin C, Cohen-Solal M, Beutrenil J, et al. Genetic and environmental factors affect bone density variances of families of men and women with osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002,87:2053-2059.
- 3 Nguyen T, Livshits G, Center, J, et al. Genetic determination of bone mineral density; evidence for a major gene. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003,88:3614-3620.
- 4 Huizenga NA, Koper JW, Lange KP, et al. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associate with an increased sensitivity to glucocorticoids *in vivo*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998,83:144-151.
- 5 DeRijk RH, Schaaf M, de Kloet ER. Glucocorticoid receptor variants: clinical implications. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2002,81(2):103-122.
- 6 Nagano M, Nakamura T, Ozawa S, et al. Allele-specific long-range PCR/sequencing method for allelic assignment of multiple single nucleotide polymorphisms. *J Biochem Biophys Methods*, 2003,55:1-9.
- 7 Lei SF, Deng FY, Liu XH, et al. Polymorphisms of four bone mineral density candidate genes in Chinese populations and comparison with other populations of different ethnicity. *J Bone Miner Metab*, 2003,21:34-42.
- 8 Canalis E, Delany A. Mechanisms of glucocorticoid action in bone. *Ann N Y Acad Sci*, 2002,966:73-81.
- 9 Cooper MS, Blumsohn A, Goddard PE, et al. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity predicts the effect of glucocorticoids on bone. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003,88:3874-3877.
- 10 Van Rossum EF, Lamberts SW. Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. *Recent Prog Horm Res*, 2004,59:333-357.

(收稿日期:2004-03-18)