

广州汉族成年人维生素 D 受体基因分布及其与骨密度关系的研究

吴文 傅祖植

【摘要】 目的 了解中国广州地区人群 VDR 基因多态性的分布及其与骨密度的关系。**方法** 选取居住广州地区的汉族成年人 396 例。应用 PCR-RFLP 等生物学技术检测 VDR 基因,用双能 X 线骨密度仪(DEXA)对入选的大部分对象进行了全身、腰椎正侧位,股骨近端 BMD 检测。**结果** VDR 基因分布频率是 BB 6.5%、Bb 48.2%、bb 45.3%;本组对象峰值骨量出现在 30~39 岁组,并且以 Bb 基因型的 BMD 值最高;3 种基因型按 BMD 大小排列顺序为: Bb > BB > bb,但只有 Bb 与 bb 两基因型的 BMD 存在着差异。**结论** ①VDR 基因多态性与种族、居住地区和人群不同有关。②峰值骨量出现在 30~39 岁组,以 Bb 基因型对应较高的 BMD,bb 基因型对应较低的 BMD。③VDR 基因型与 BMD 间存在着关联,但对其骨质疏松相对高危人群的预测价值有待进一步的深入研究。

【关键词】 维生素 D 受体; 基因多态性; 骨密度

The Frequencies of the vitamin D Receptor Gene Alleles and its Association with Bone Mineral Density in Adults of Han Nationality in Guangzhou Area WU Wen*, FU Zuzhi. * Osteoporosis Research center, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, China

【Abstract】 Objective To investigate the distribution of Vitamin D Receptor (VDR) genotypes and the association of VDR gene polymorphism with bone mineral density (BMD) in Guangzhou Area. **Methods** 394 adults of Han nationality were included in Guangzhou. Their VDR genotypes were determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Their BMD was determined by dual energy x-ray absorptiometry (DEXA) at total body. Lumbar spine and proximal femur. **Results** The frequency of the VDR gene are: BB 6.5%, Bb 48.2%, bb 45.3%, respectively. The peak bone mass was appeared in the 30~39 years old subgroup, and the BMD of Bb was the highest. The order of 3 genotypes considering the quantities of BMD were: Bb > BB > bb, the difference was found between the BMD of Bb and bb genotype. **Conclusions** ①VDR gene polymorphism was related to ethnic, regional and populational differences. ②The peak bone mass was appeared in the 30~39 years old subgroup, the BMD which related to Bb genotype was higher than the bb genotype's significantly. ③VDR genotypes was related to BMD, but its expected value for the relative risk of osteoporosis is still need further investigation.

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

本研究针对广州地区的汉族成年人,在分析研究他们维生素 D 受体基因分布频率的基础上,进一步观察 VDR 基因与 BMD 的关系,以期了解中国南方广州地区人群 VDR 基因多态性的分布及其与 BMD 的关系。为探讨从遗传标志方面对骨质疏松相对高危人群进行筛查提供理论依据,并有利于本病的早期防治。

材料和方法

1. 研究对象

396 例研究对象分别来自本院体检的 20 个不同单位,均为居住在广州地区的汉族成年人。经详细病史询问及体检检查,初步排除了影响骨代谢的其它疾病,同时也未服影响骨代谢的药物。并经常规生化检查,确定为肝肾功能正常,血钙、血磷、血碱性磷酸酶均在正常范围内。其中男性 150 人,平均年龄为 54.87(19~91)岁,女性 246 人,平均年龄 49.14

基金项目:广东省科技厅资助项目(99M04704Q)

作者单位:510080 广东省人民医院骨质疏松防治中心(吴文);
中山大学二附院内分泌科(傅祖植)

(20~78),绝经后妇女 84 人,平均年龄 53.6 岁。

2. 主要试剂及仪器:

PCR 自动循环仪(美国 PE 公司产生,9600 型);Taq DNA 聚合酶,4dNTP 购自 Promega 公司;内切酶 BsmI 购自 New England 公司;VDR 基因 BsmI 多态性位点 PCR 扩增的引物序列,由中国科学院上海细胞生物研究所合成提供。

3. VDR 基因型的检测

PCR 扩增及酶切(PCR-RFLP)确定 VDR 基因型,对 396 例标本均进行重复 2~4 次的分析(个别标本因损坏未做 VDR 基因型测定)。按常规方法提取人类白细胞中 DNA,采用二对引物用聚合酶链反应(PCR)方法扩增特定基因段,在 9600 型 PCR 自动新循环仪上进行反应,聚合酶为 Tag 酶,对 NDA 的扩增在 95℃ 1 min,70℃ 1 min,72℃ 2 min 条件下进行 35 个循环完成,用限制性内切酶(BsmI)在 65℃ 过夜消化 PCR 产物。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳来分离消化后的 DNA 酶切片段,根据酶切片段在琼脂糖上的位置和数量来判断 VDR 基因型,基因型的多态性记为 BB、bb、Bb 型。

4. 骨密度测定:采用美国 Hologic 公司生产的 QDR-2000+ 型双能 X 线骨密度仪(DEXA)对 BMD 进行检测,在 396 例入选对象中,381 例接受了全身 BMD 检测,接受腰椎正、侧位及股骨近端 BMD 检测的人数不完全相同,其测量精确度(CV)为 1.7%。

5. 分组:为避免性别对 BMD 的影响,男女两性分开研究,根据每 10 岁为一年龄段。男女两性各分为 30 岁以下组,30~39 岁组及 40 岁以上 3 个年龄段组,为避免绝经对 BMD 的影响,绝经后的妇女再分为 1 组。

6. 统计学处理:构成比分析采用 χ^2 检验,均数比较采用 LSD(最小有意义差异检验方法)检验,检验水准均为 $\alpha=0.05$,全部计算均用 SPSS 10.0 软件包完成。

结 果

1. VDR 基因 BsmI 多态性位点的研究结果

VDR 基因多态性的分布频率:本组广州汉族成年人的 VDR 基因型:BB: 6.5%、Bb: 48.2%、bb: 45.3%。男女之间 3 种基因型分布频率无差异($P>0.05$)。

2. VDR 3 种基因型与 BMD 的关系

为了排除性别对骨密度的影响,男女分开两组分别作处理。同时,由于按年龄分组的 3 种基因型年龄构成比相同,因此也排除了年龄对骨密度的影响,而只考虑 3 种不同的基因型与骨密度的关系,见表 2,3。

表 1 男女两性基因型频率比较

性别	基因型			合计(%)
	BB(%)	Bb(%)	bb(%)	
男	13(8.9)	71(48.6)	62(42)	146(100.0)
女	25(5.0)	115(47.9)	113(47.1)	240(100.0)
合计	25(6.5)	186(48.2)	175(45.3)	386(100.0)

注: $\chi^2=2.573, P=0.276$

表2 男性 3 种基因型观察对象的基因年龄构成比

基因型 (%)	年龄(岁)			合计(%)
	< 30	30~39	40>	
BB	3(23.1)	3(23.1)	7(53.8)	13(100.0)
Bb	7(9.9)	7(9.9)	57(80.3)	71(100.0)
bb	7(11.3)	14(22.6)	41(66.1)	62(100.0)
合计	17(11.6)	24(16.4)	105(71.9)	146(100.0)

注: $\chi^2=26.871, P=0.143$

表3 女性 3 种基因型观察对象的基因年龄构成比

基因型 (%)	年龄(岁)			合计(%)
	< 30	30~39	40>	
BB		4(33.3)	8(66.7)	12(100.0)
Bb	13(11.3)	22(19.1)	80(69.6)	115(100.0)
bb	11(9.7)	19(16.8)	83(73.5)	113(100.0)
合计	24(10.0)	45(18.8)	171(71.3)	240(100.0)

注: $\chi^2=3.158, P=0.532$

1. 男性组:用两两比较方法,用 LSD 检验,只发现 Bb 与 bb 两型间的 BMD 存在差异($P<0.05$),并且只在腰椎侧位,其余部位未见差异($P>0.05$),见表 4。

2. 女性组:Bb 与 bb 两基因型间存在着多个部位的 BMD 的差异($P<0.05$),其中包括:腰椎的正侧位、全身、股骨颈、大转子、沃氏三角,见表 5。

3. 绝经组的妇女:其 Bb 与 bb 两基因型间的 BMD 差异部位明显减少,只有腰椎侧位、大转子区 BMD 存在差异($P<0.05$)。

4. 峰值骨量:男女两组,南方广州地区本组观察对象峰值骨量出现在 30~39 岁组。并且 Bb 基因型对应较高的 BMD,bb 基因型对应较低的 BMD,且两者间有统计学意义($P<0.05$)。

表4 男性 3 种基因型观察对象的骨密度比较

检测部位	BB			Bb			bb			合计		
	例数	均值	标准差	例数	均值	标准差	例数	均值	标准差	例数	均值	标准差
全身	12	1.061	0.087	70	1.066	0.097	61	1.049	0.095	143	1.056	0.095
腰椎正位	13	0.807	0.076	71	0.814	0.155	61	0.780	0.115	145	0.796	0.134
腰椎侧位	13	0.925	0.104	71	0.967*	0.178	60	0.891	0.178	144	0.931	0.159
股骨颈	13	0.740	0.106	66	0.743	0.131	60	0.720	0.134	139	0.739	0.129
大转子	13	0.607	0.765	65	0.618	0.117	60	0.606	0.106	138	0.612	0.108
沃氏三角	12	0.569	0.175	65	0.571	0.163	60	0.559	0.174	137	0.569	0.168

注:与 bb 基因型之间腰椎侧位的 BMD 比较 * $P < 0.05$

表5 女性 3 种基因型观察对象的骨密度比较

检测部位	BB			Bb			bb			合计		
	例数	均值	标准差	例数	均值	标准差	例数	均值	标准差	例数	均值	标准差
全身	12	0.995	0.164	115	1.008*	0.103	111	0.964	0.106	238	0.987	0.109
腰椎正位	12	0.867	0.198	115	0.907*	0.180	113	0.835	0.156	240	0.871	0.173
腰椎侧位	11	0.693	0.243	115	0.729*	0.155	112	0.675	0.138	238	0.702	0.154
股骨颈	12	0.691	0.148	110	0.733*	0.128	108	0.685	0.123	230	0.711	0.128
大转子	12	0.557	0.157	110	0.587*	0.103	108	0.553	0.109	230	0.571	0.109
沃氏三角	12	0.584	0.257	110	0.605*	0.184	108	0.552	0.179	230	0.579	0.187

注:与 bb 基因型之间所有测定部位的 BMD 比较 * $P < 0.05$

讨 论

BMD 是衡量骨量的一个重要指标,受遗传与环境因素影响,尤其遗传因素最为重要。1994 年, Morrison 等^[1]经实验证实 VDR 基因多态性与 BMD 相关,且可占 BMD 遗传因素的 75% 左右。来自日本的人群调查表明:虽然 VDR 基因多态性的分布频率不同于高加索人种,但 BMD 仍有着高加索人种的相似改变^[2]。随后,在多种民族,同一民族内的双胞胎及人群的研究中并未发现 VDR 基因多态性与 BMD 之间存在着很强的相关^[3],甚至有些报道 VDR 基因多态性与 BMD 没有相关^[4],而我国北方人及香港人群的研究结果同国外比较也存在着较大的差异^[5,6],本研究初步提供一组南方汉族成年人 VDR 基因 BsmI 位点的多态性的分布情况,其中, BB 6.5%、Bb 48.2%、bb 45.3%。研究结果与国外同类研究结果比较表明,中国南方一组观察对象 VDR 基因多态性分布频率明显不同于高加索人种^[7],同日本人也有差异^[8],与朝鲜人也有差别^[9],同中国北方一组观察对象比较同样存在着差异,说明 VDR 基因多态性的分布频率不仅同种族有关,而且同一种族的不同人群中同样存在着差异。原因除了遗传因素以外,环境因素(包括饮食、生活习惯、锻炼等)以及遗传因素与环境因素的相互影响可能使同一人种产生了不同的基因频率。

本研究 VDR 基因多态性与 BMD 的关系提示,广州本组对象 VDR 基因 BsmI 位点多态性与 BMD

间存在着关联,无论男性、女性,还是绝经后的妇女, Bb 对应较高的 BMD, bb 对应较低的 BMD, 并且 Bb, bb 两基因型分布频率分别为 48.2% 和 45.3%。因此,结果较为可靠,但其对骨质疏松相对高危人群的预测价值有待进一步的深入研究。本结果与国外大部分研究结果不一致^[5],唯有荷兰一文献报导 bb 基因型对应低 BMD, 但与中国北方人群,特别是绝经后的妇女其大转子区出现低 BMD 相对应 bb 基因型是相一致的^[7],这种不同种族及一种族的不同人群中的差异可以是因为遗传因素与环境因素等多因素的相互作用结果。

参 考 文 献

- Morrison NA, Qi JC, Tokita A, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature*, 1994, 367(6460):284-287.
- Tokita A, Matsumoto H, Morrison NA, et al. Vitamin D receptor alleles, bone mineral density and turnover in premenopausal Japanese women. *J Bone Miner Res*, 1996, 11:1003-1009.
- Spector TD, Keen RW, Arden NA, et al. Influence of vitamin D receptor genotype on bone density: A UK twin study. *Br Med J*, 1995, 310: 1357-1360.
- Houston LA, Grant SFA, Reid DM, et al. Vitamin D polymorphism bone mineral density and osteoporotic vertebral fracture: studies in a UK population. *Bone*, 1996, 18:249-252.
- Zhao J, Zhou X, Meng X, et al. Polymorphism of vitamin D receptor gene and its association with bone mineral density and osteoporosis in Chinese. *Chin Med J Engl*, 1997, 110:366-371.
- Lau EM, Young RP, Ho SC, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density in elderly Chinese men and women in Hong Kong. *Osteoporosis Int*, 1999, 10:226-230.

(下转第 311 页)

序与通气功能障碍程度呈正相关。在相对稳定的骨生成中,有 73.6% 的病人出现剧烈的骨吸收,并表现出 I 型胶原 C 末端肽胶联 (CTX) 浓度增高。在 COPD 病人中,致炎细胞因子和骨密度及骨代谢指数间存在密切相关性。提示:在肺源性骨量减少的发病机制中细胞因子介导的机制起着重要的作用。

Muratore 等^[3]认为:类固醇治疗是继性腺功能缺乏及衰老之后骨质疏松发病的第三位原因。Praet 等^[4]在男性慢性支气管炎与骨质疏松的风险一文中指出:慢性支气管炎单服支气管扩张剂导致小梁骨骨密度降低。服用糖皮质激素即或小剂量亦可导致小梁骨和皮质骨骨密度均降低,并且糖皮质激素使性腺功能减低,从而产生低骨量和骨钙素降低。慢性支气管炎导致骨质疏松的原因可能使骨形成减慢。严重慢性阻塞性肺部疾病患者,由于存在着严重的通气功能障碍,长期使用支气管扩张剂和内服及吸入性类固醇激素,均导致骨吸收增强,骨质疏松发病率显著增高。

心脑血管病的实质是动脉粥样硬化。动脉硬化导致骨质疏松的原因, Laroche^[5]解释为肾血管动脉硬化导致 VitD 代谢紊乱以及营养骨的动脉血管硬化导致骨局部缺血所致。其病理生理机制并不完全清楚,可能包括激素、骨组织重塑和修复活动所依赖的细胞因子、以及骨髓造血功能等因素的作用。

大多数作者认为糖尿病可导致骨质疏松,也有作者认为骨质疏松不是糖尿病的并发症^[6]。糖尿病治疗的重要手段是运动,主要是行走、爬山、跳舞、打

太极拳等。统计数据显示糖尿病组在股骨颈和桡骨远端部位骨密度显著高于 COPD 组,亦高于其他组。提示负重运动可有效预防和延缓老年人骨质疏松的发生。

本研究提示:健康状况的老年男性也有 60% 发生骨质疏松,慢性阻塞性肺部疾病人群易患骨质疏松,糖尿病、心脑血管疾病的骨量减少与健康状况者相似;老年男性慢性阻塞性肺部疾病患者是骨质疏松的重点防治对象;检测老年男性慢性支气管炎伴骨质疏松最敏感的部位是 L₂₋₄。COPD 组未包括慢性支气管炎者,故使此组骨质疏松的发病率达到 100%,今后可扩大研究范围。

参 考 文 献

- 1 中国老年学学会骨质疏松诊断标准学科组. 中国人原发性骨质疏松诊断标准(试行). 中国骨质疏松杂志, 1999, 5: 1-4.
- 2 Kocheikova EA, Geltser BI, Semisotova EF, et al. Biochemical and immunological markers of osteoporosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Klin Med (Mosk)*, 2002, 80(10): 31-35.
- 3 Muratore M, Santacesaria G, Quarta E, et al. Prevention with clodronate of osteoporosis secondary to inhaled corticosteroid treatment in patients with chronic asthmatic bronchitis. *Int J Clin Pharmacol Res*, 2000, 20(3-4): 61-64.
- 4 Preat JP, Peretz A, Rozenberg S, et al. Risk of osteoporosis in men with chronic bronchitis. *Osteoporos Int*, 1992, 2: 257-261.
- 5 Laroche M. Arteriosclerosis and osteoporosis. *Presse Med*, 1996, 25(2): 52-54.
- 6 Sahin G, Bagis S, Cimen OB, et al. Lumbar and femoral bone mineral density in type 2 Turkish diabetic patients. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 2001, 44(4): 141-143. (收稿日期: 2004-04-10)

(上接第 308 页)

加强芳香化酶活性,以及 P450AROM mRNA 在这些细胞的表达^[3-5]。本文中绝经后妇女骨质疏松组与对照组相比, DHEA、DHEA-S 显著降低, DHEA 和 DHEA-S 与年龄负相关。总之,血清中某些性激素在绝经后骨质疏松中有改变。

参 考 文 献

- 1 Ricci TA, Heymsfield SB, Pierson RN Jr, et al. Moderate energy restriction increases bone resorption in obese postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*, 2001, 73: 347-352.

(上接第 306 页)

- 7 Hansen TS, Abrahamsen B, Henriksen RL, et al. Vitamin D receptor alleles do not predict bone mineral density or bone loss in Danish perimenopausal women. *Bone*, 1998, 22: 571-575.
- 8 Yanagi H, Tomura S, Kawanami K, et al. Vitamin D receptor gene poly-

- 2 Goodyer IM, Park RJ, Netherton CM, et al. Possible role of cortisol and dehydroepiandrosterone in human development and psychopathology. *Br J Psychiatry*, 2001, 179: 243-249.
- 3 Robinson B, Cutolo M. Should dehydroepiandrosterone replacement therapy be provided with glucocorticoids? *Rheumatology (Oxford)*, 1999, 38: 488-495.
- 4 Mazat L, Lafont S, Berr C, et al. Prospective measurements of dehydroepiandrosterone sulfate in a cohort of elderly subject: relationship to gender, subjective health, smoking habits and 10-year mortality. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 8145-8150.
- 5 Yen SS. Dehydroepiandrosterone sulfate and longevity: new clues for an old friend. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 8167-8169.

(收稿日期: 2004-04-20)

morphisms are associated with osteoporosis in Japanese women. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81: 4179-4181.

- 9 Lim SK, Yong SP, Jae MP, et al. Lack of association between vitamin D receptor genotypes and osteoporosis in Koreans. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995, 80: 3677-3681. (收稿日期: 2004-05-06)