

绝经后骨质疏松人群雌激素受体基因 Xba I 多态性和年龄对骨密度的影响

葛继荣 林一萍 朱小香 王和鸣

【摘要】 目的 分析绝经后骨质疏松人群雌激素受体(ER)基因 Xba I 多态性与骨密度的相关性以及在基因多态性下年龄、绝经年限及体重指数(BMI)对骨密度的影响。**方法** 用双能 X 线骨密度仪检测患者 151 例,以 PCR-RFLP 的方法检测 ER 基因 Xba I 多态性,SPSS 软件进行相关回归分析。**结果** ER 基因型的频率分布为 XX 型 16.6%,Xx 型 67.5%,xx 型 15.9%,XX 型的骨密度在腰椎、股骨颈和 Ward's 三角要高于 Xx 型和 xx 型,但 ER 多态性与骨密度无相关性。在 Xx 型和 XX 型人群中年龄越大,绝经年限越长,腰椎和股骨上端骨密度则越低。在 XX 型中,BMI 是影响股骨颈和 Ward's 三角骨密度的主要因素。而在 xx 型中,腰椎和 Ward's 三角骨密度与年龄、BMI 和绝经年限无相关性,绝经年限与股骨颈骨密度相关,大转子与 BMI 相关。**结论** 福州地区绝经后骨质疏松人群 ER 基因 Xba I 基因型与骨密度无明显相关性,但在不同基因型人群中,其骨密度的丢失趋势和影响因素也各异,临床上应采用不同的防治措施。

【关键词】 雌激素受体; Xba I 基因型; 骨密度; 骨质疏松

Effect of Xba I polymorphisms of estrogen receptor gene and age on bone mineral density in postmenopausal women GE Jirong, LIN Yiping, ZHU Xiaoxiang, et al. Fujian Institute of TCM, Fuzhou 350003, China

【Abstract】 Objective To study the relationship between Xba I polymorphisms of the estrogen receptor (ER) gene and bone mineral density (BMD) and the effect of age, duration of menopause and body mass index (BMI) on BMD under different genotypes in postmenopausal women. **Methods** The BMD of 151 postmenopausal women were measured by dual energy X-ray absorptiometry. The polymorphisms of ER gene were detected by PCR-RFLP method. The correlation coefficients and stepwise regressions among the results were analyzed using SPSS software. **Results** The frequencies of ER genotypes of XX, Xx and xx were 16.6%, 67.5% and 15.9%, respectively. Although the BMD of lumbar spines, femur neck and Ward's region in XX were higher than in Xx and in xx, the correlations between the polymorphisms of ER gene and the BMD were not significantly different. In the Xx's and the XX's women, the older their ages and the longer their durations of menopause, the lower were their BMD. In the XX's patients, BMI was also the main factor affecting the BMD of femur neck and Ward's region. In the xx' patients, there were no correlations between the BMD of lumbar spines, Ward's region and age, BMI and duration of menopause, but there existed correlations between femur neck and duration of menopause, and between trochanter and BMI. **Conclusions** There is no correlation between the Xba I polymorphisms of ER gene and BMD, but the tendency of bone loss and influencing factors are different among patients of various genotypes; hence we should take different measures for prevention and treatment of osteoporosis.

【Key words】 Estrogen receptor; Xba I polymorphisms; Bone mineral density; Osteoporosis

骨质疏松的发病因素大体可分为遗传因素和环境因素两类。家系和双生子研究表明无论骨峰值、骨密度还是骨折危险性,均有强烈的遗传性^[1]。由

于绝经后妇女的雌激素不足是导致绝经后骨质疏松症发生的主要原因,雌激素受体(Estrogen Receptor, 简称 ER)基因已成为研究骨质疏松症的一个重要后选基因。研究表明 ER 基因突变可造成人体骨密度下降。ER 基因多态性可能与骨质疏松症有关^[2]。

基金项目:福建省卫生厅重点课题(No. 202)

作者单位:350003 福州,福建省中医药研究院

为此,我们对福州地区绝经后骨质疏松人群 ER 基因 Xba I 多态性与骨密度之间的关系以及在多态性下年龄、绝经年限、体重和体重指数(Body Mass Index,简称 BMI)对骨密度的影响进行了初步研究,为临床筛选、防治骨质疏松高危人群提供理论依据。

材料和方法

1. 研究对象

从福州地区常住汉族人口中随机抽样检测绝经后骨质疏松患者 151 例,均为自然绝经 1 年以上,年龄在 48 ~ 73 岁;XX 型、Xx 型和 xx 型 3 组患者例数在不同年龄段分布基本均匀,秩和检验 $P > 0.05$,无明显差异。排除继发性骨质疏松、患有影响骨代谢的疾病及长期服用影响骨代谢药物的患者。骨质疏松诊断参照中国老年学会骨质疏松委员会制定的标准^[3]。

2. 方法

(1)采用美国豪诺士公司生产的 Hologic QDR-4500W 型双能 X 线骨密度仪检测患者腰椎正位(L₂-L₄)、股骨颈、大转子和 Ward's 三角骨密度,同时测量患者身高、体重,并计算出体重指数[BMI(kg/m²) = 体重(kg)/身高(m²)]。记录患者的绝经年龄和绝经年限。

(2)试剂:全血 DNA 提取试剂盒由北京天为时代公司提供,Taq DNA 聚合酶、dNTP、10 × PCR 缓冲液为北京华美生物工程公司产品,限制性内切酶

Xba I 为 Promega 公司产品,ER 引物由北京三博远志生物技术有限公司提供(序列为:P₁ 5'-CTGCCACCC-TATCTGTATCTTTCTCTATTCTCC-3'; P₂ 5'-TCTTTCTCTGCCACCCCTGGCGTCGATTATCTGA-3')。

(3)ER 基因型检测:静脉取血,ACD 抗凝,采用 DNA 试剂盒提取 DNA 模板。PCR 扩增:反应体系 50 μl,其中 10 × PCR 缓冲液 5 μl,10 mmol/L dNTP 1 μl,P₁、P₂ 引物各 0.4 μmol/L,模板 DNA 100 ng,Taq DNA 聚合酶 1 U;置热循环仪中 94℃ 预变性 30 s,61℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 90 s,循环 30 次。PCR 反应后,取扩增物 5 μl 经 1% 琼脂糖电泳,紫外光下可见 1.3 kp 特异扩增带;取扩增物 10 μl,用 5 U 限制性内切酶 Xba I 酶切,37℃,2 h。取消化产物 10 μl,1% 琼脂糖电泳,EB 染色,紫外光下可见纯合子无酶切位点为 1.3 kp(XX),纯合子有酶切位点为 0.9 kp 和 0.4 kp(xx),杂合子为 1.3 kp、0.9 kp 和 0.4 kp(Xx)。

(4)统计学处理:采用 SPSS 软件进行非参数秩和检验(正态分布资料用 *t* 检验),线性相关和逐步回归分析,双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有显著意义。

结 果

1. ER 基因型频率分布:XX 型 25 例,占 16.6%,Xx 型 102 例,为 67.5%,xx 型 24 例,占 15.9%。各基因型的年龄、身高、体重、BMI、绝经年龄、绝经年限比较见表 1。

表 1 ER 基因各型的年龄、身高、体重、BMI、绝经年龄、绝经年限比较($\bar{x} \pm s$)

基因型	平均年龄(岁)	身高(m)	体重(kg)	BMI(kg/cm ²)	绝经年龄(岁)	绝经年限(年)
Xx	61.38 ± 5.84	1.56 ± 0.05	56.42 ± 7.94	23.06 ± 2.98	49.09 ± 3.21	12.35 ± 6.45
xx	62.63 ± 4.35	1.56 ± 0.04	58.75 ± 6.29	24.29 ± 2.56	49.29 ± 3.72	13.33 ± 6.34
XX	61 ± 6.0	1.56 ± 0.05	57.28 ± 7.16	23.27 ± 2.34	49.4 ± 2.22	11.60 ± 6.61

经统计学处理,年龄、身高、体重、BMI、绝经年龄及绝经年限在 XX 型、Xx 型和 xx 型组间比较,均 $P > 0.05$,差异无显著性,说明 3 组的年龄、身高、体重、BMI、绝经年龄及绝经年限分布均匀,具有可比性。

2. XX 型、Xx 型和 xx 型 3 组腰椎、股骨颈、大转子和 Ward's 三角骨密度比较见表 2。

表 2 XX 型、Xx 型和 xx 型 3 组腰椎、股骨颈、大转子和 Ward's 三角骨密度比较(g/cm², $\bar{x} \pm s$)

基因型	腰椎	股骨颈	大转子	Ward's
Xx	0.745 ± 0.09	0.679 ± 0.07	0.642 ± 0.07P	0.469 ± 0.11
xx	0.739 ± 0.09	0.695 ± 0.07	0.557 ± 0.09	0.466 ± 0.08
XX	0.746 ± 0.07	0.704 ± 0.09	0.558 ± 0.08	0.503 ± 0.16

经统计学处理,腰椎、股骨颈、大转子和 Ward's 三角骨密度在 XX 型、Xx 型和 xx 型组间比较, $P > 0.05$,差异无显著性。

3. Xx 型骨密度与年龄、身高、体重、BMI、绝经年限及绝经年龄的相关性,见表 3。

由表 3 可见,在 Xx 型骨质疏松人群中,年龄、绝经年限与腰椎和股骨上端的骨密度存在明显的负相关($P < 0.05$),说明绝经年限越长、年龄越大,其骨密度就越低。逐步回归分析:影响腰椎骨密度的主要因素有年龄,其回归方程: $Y = 0.959 - 0.0035X$, $r = -0.209$, $P = 0.035$ 。影响股骨颈骨密度的主要因

素有年龄,其回归方程: $Y = 0.915 - 0.0039X$, $r = -0.308$, $P = 0.002$ 。影响大转子骨密度的主要因素有年龄和体重,其回归方程: $Y = 0.640 - 0.0044X_1 + 0.0030X_2$, 年龄: $r_1 = -0.337$, $P_1 = 0.000$, 体重: $r_2 = 0.322$, $P_2 = 0.001$ 。影响 Ward's 三角骨密度的主要

因素有年龄,其回归方程: $Y = 0.955 - 0.0079X$, $r = -0.427$, $P = 0.000$ 。

4. XX 型骨密度与年龄、身高、体重、BMI、绝经年限及绝经年龄的相关性,见表 4。

表 3 Xx 型骨密度与年龄、身高、体重、BMI、绝经年限及绝经年龄的相关性

指标	腰椎		股骨颈		大转子		Ward's	
	r	P	r	P	r	P	r	P
年龄	-0.256	0.009	-0.348	0.000	-0.272	0.006	-0.425	0.000
绝经年龄	0.089	0.375	-0.054	0.592	-0.048	0.635	0.047	0.640
绝经年限	-0.226	0.022	-0.288	0.003	-0.214	0.031	-0.390	0.000
身高	0.142	0.153	0.204	0.040	0.162	0.104	0.033	0.744
体重	0.113	0.260	0.187	0.060	0.214	0.031	-0.021	0.832
体重指数	0.050	0.619	0.094	0.345	0.148	0.137	-0.011	0.914

表 4 XX 型骨密度与年龄、身高、体重、BMI、绝经年限及绝经年龄的相关性

指标	腰椎		股骨颈		大转子		Ward's	
	r	P	r	P	r	P	r	P
年龄	-0.530	0.006	-0.499	0.011	-0.477	0.016	-0.317	0.122
绝经年龄	0.256	0.216	0.303	0.140	-0.127	0.546	0.279	0.177
绝经年限	-0.606	0.001	-0.565	0.003	-0.435	0.030	-0.353	0.084
身高	0.051	0.808	0.102	0.628	0.264	0.202	-0.063	0.763
体重	-0.239	0.250	0.478	0.160	0.629	0.001	0.483	0.014
体重指数	0.266	0.199	0.591	0.002	0.561	0.004	0.747	0.000

从表 4 可知,XX 型的年龄、绝经年限与腰椎、股骨颈及大转子的骨密度存在明显的负相关,体重、BMI 也与股骨上端的骨密度有显著相关性。逐步回归分析:影响腰椎骨密度的主要因素是绝经年限,其回归方程: $Y = 0.818 - 0.0062X$, $r = -0.569$, $P = 0.003$ 。影响股骨颈骨密度的主要因素有 BMI 和绝经年限,其回归方程: $Y = 0.204 + 0.0242X_1 - 0.0055X_2$, BMI: $r_1 = 0.599$, $P_1 = 0.000$, 绝经年限: r_2

$= -0.381$, $P_2 = 0.011$ 。影响大转子骨密度的主要因素有体重和年龄,其回归方程: $Y = 0.495 + 0.0069X_1 - 0.0055X_2$, 体重: $r_1 = 0.582$, $P_1 = 0.001$, 年龄: $r_2 = -0.384$, $P_2 = 0.013$ 。影响 Ward's 三角骨密度的主要因素有 BMI,其回归方程: $Y = -0.678 + 0.05X$, $r = 0.732$, $P = 0.000$ 。

5. xx 型骨密度与年龄、身高、体重、BMI、绝经年限及绝经年龄的相关性,见表 5。

表 5 xx 型骨密度与年龄、身高、体重、BMI、绝经年限及绝经年龄的相关性

指标	腰椎		股骨颈		大转子		Ward's	
	r	P	r	P	r	P	r	P
年龄	-0.319	0.126	-0.284	0.058	-0.252	0.234	-0.110	0.608
绝经年龄	0.274	0.194	0.295	0.052	0.472	0.020	0.334	0.111
绝经年限	-0.367	0.078	-0.300	0.044	-0.298	0.157	-0.235	0.268
身高	0.061	0.777	0.067	0.654	-0.152	0.479	0.058	0.789
体重	0.192	0.369	0.271	0.069	0.499	0.013	0.087	0.686
体重指数	0.069	0.747	0.244	0.096	0.411	0.046	-0.019	0.930

表 5 表明 xx 型绝经年限与股骨颈骨密度相关,绝经年龄、体重、BMI 与大转子骨密度相关,年龄、身高、体重、BMI、绝经年限、绝经年龄与腰椎和 Ward's 三角骨密度无相关性。逐步回归分析:股骨颈与绝

经年限的回归方程: $Y = 0.779 - 0.0063X$, $r = -0.523$, $P = 0.009$ 。大转子:影响其骨密度的主要因素是绝经年龄,回归方程: $Y = 0.023 + 0.0108X$, $r = 0.459$, $P = 0.024$ 。

讨 论

自 1996 年 Kobayashi 等^[2]首次报道绝经后妇女的骨密度与 ER 基因多态性有关以来,国内外与此结果相同或不同的报道不断出现。Ogawa 等^[4]在日本 204 名健康绝经后妇女中研究定位于 ER- β 基因两翼区的二核苷酸(胞嘧啶-腺嘌呤;CA)重复多态性与骨密度的联系,发现 ER- β 位点遗传变异与骨密度变化及日本妇女绝经后骨质疏松相关。Mizunuma 等^[5]研究表明 Xx 基因型的绝经前妇女骨密度明显高于 xx 型妇女,但随着停经的开始,这一关系消失,提示 Xx 基因型可能对青年时代骨峰值的取得有一定意义。刘建民等^[6]报道 ER 基因 Xba I 等位基因型的频率分布为 XX 型 7%, Xx 型 27.4%, xx 型 65.6%, XX 型的腰椎(L₂₋₄)骨密度 Z 值明显高于 Xx 型和 xx 型($P < 0.001$),认为 ER 基因 Xba I 基因型与骨密度有一定的关系。而 Han 等^[7]研究韩国 518 例健康妇女(20~74 岁),发现在高骨量丢失和正常骨量丢失人群中,ER 基因型比例差异无显著性,提示 ER 与骨密度及骨转换无关。Bagger 等^[8]对丹麦健康绝经后妇女 ER 基因 Pvu II 及 Xba I 酶切片段与骨密度关系进行前瞻性调查后,发现所有数据不能证明 ER 基因多态性对骨密度或骨丢失率产生明显作用。薛延等^[9]报道北京地区绝经后妇女 ER 基因 Xba I 等位基因型的频率分布为 XX 型 27.3%, Xx 型 41.3%, xx 型 23%, XX 型的腰椎(L₂₋₄)骨密度高于 Xx 型和 xx 型,大转子、Ward's 三角骨密度低于 Xx 型和 xx 型,但均差异无显著性,认为 ER 基因 Xba I 基因型与骨密度无明显相关性。

本研究发现福州地区绝经后骨质疏松者 ER 基因型的频率分布为 XX 型 16.6%, Xx 型 67.5%, xx 型 15.9%, Xx 型频率明显高于 XX 型和 xx 型,xx 型最低。在 3 型组间年龄、身高、体重、BMI、绝经年限及绝经年龄具有可比性的情况下,比较 3 型组间各部位的骨密度得出 XX 型的骨密度在腰椎、股骨颈和 Ward's 三角要高于 Xx 型和 xx 型,但统计学处理无明显差异,表明 ER 基因的 Xba I 多态性与各部位的骨密度无明显的相关性。对于本结果与上述一些研究结果存在差别的原因可能是与不同人群、不同地域、不同饮食习惯等因素有关,这有待我们以后做

过进一步的研究。

通过相关性和逐步回归分析发现:在影响骨密度的年龄、身高、体重、BMI、绝经年限及绝经年龄因素中,不同基因型其影响因素也不同:在 Xx 型中,影响腰椎和股骨上端骨密度的主要因素均为年龄;而在 XX 型骨质疏松人群中,影响腰椎的主要因素是绝经年限,影响股骨颈的主要因素有 BMI 和绝经年限,影响大转子的主要因素有体重和年龄,影响 Ward's 三角的主要因素有 BMI;但在 xx 型中,影响大转子的主要因素是绝经年龄。

本研究表明,对于绝经后骨质疏松人群,虽然 ER 基因的 Xba I 多态性与骨密度无明显的相关性,但对于不同 ER 基因 Xba I 基因型,患者骨密度的丢失趋势和影响骨密度的因素也不同,各型都有一定的规律。因此我们在临床防治骨质疏松时,应针对不同基因型的人群采用不同的防治措施。

参 考 文 献

- 1 Richard W, Paul J. Genetic factors in osteoporosis. *Drug & Aging*, 1997, 11:333-337.
- 2 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.
- 3 中国老年学学会骨质疏松委员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, 5:13.
- 4 Ogawa S, Hosoi T, Shiraki M, et al. Association of estrogen receptor beta gene polymorphism with bone mineral density. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 16, 269: 537-541.
- 5 Mizunuma H, Hosoi T, Okano H, et al. Estrogen receptor gene polymorphism and bone mineral density at the lumbar spine of pre- and postmenopausal women. *Bone*, 1997, 21:379-383.
- 6 刘建民, 朱汉民, 朱晓颖, 等. 绝经后妇女雌激素受体基因 P α 单倍型对骨密度的影响. *中华医学杂志*, 2001, 81:1295-1297.
- 7 Han K, Choi J, Moon I, et al. Non-association of estrogen receptor genotypes with bone mineral density and bone turn-over in Korean pre-, peri-, and postmenopausal women. *Osteoporos Int*, 1999, 9:290-295.
- 8 Bagger YZ, Jorgensen HL, Vestergaard AW, et al. No major effect of estrogen receptor gene polymorphisms on bone mineral density or bone loss in postmenopausal Danish women. *Bone*, 2000, 26: 111-116.
- 9 薛延, 李东, 王芊, 等. 北京地区汉族妇女雌激素受体基因 Xba I 多态性与骨密度和体重指数的关系. *遗传*, 2003, 25:137-140.

(收稿日期:2003-10-24)

本刊更正

本刊 2004 年第 3 期第 380 页作者单位为:季颖、阮祥燕 首都医科大学附属北京妇产医院。