

雌激素受体基因多态性与2型糖尿病骨量的关系

柳林 董砚虎 司元国 曲宁

【摘要】 目的 探讨雌激素受体(ER)基因多态性与2型糖尿病患者骨量的关系。方法 采用聚合酶链反应限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术检测104例2型糖尿病患者和60例健康人的ER基因型(Pvu II、Xba I位点),并用双能X线吸收法测量腰椎及股骨近端骨密度(BMD)。同时测定血清雌二醇、睾酮、胰岛素、糖化血红蛋白水平。结果 2型糖尿病患者骨密度与基因型、雌二醇、睾酮、胰岛素水平密切相关,第2,3腰椎骨密度还与BMI显著相关;健康人骨密度只受基因型与性激素影响。女性2型糖尿病患者p等位基因频率低于健康女性。男或女性2型糖尿病患者XX基因型频率、X等位基因频率均高于健康人。糖尿病组男性X等位基因频率高于糖尿病女性,健康人X等位基因频率无性别差异。结论 ER基因多态性与2型糖尿病患者骨密度密切相关,p、X等位基因可能是骨量的保护基因,性激素、胰岛素水平与2型糖尿病骨密度正相关。

【关键词】 骨密度; 2型糖尿病; 雌激素; 受体; 多态现象(遗传学)

Relationship between polymorphism of ER gene and bone mass in type 2 diabetes mellitus LIU Lin, DONG Yanhu, SI Yuanguo, et al. Department of Endocrinology, Weifang People's Hospital, Weifang 261041, China

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between polymorphism of ER gene and bone mass in type 2 diabetes mellitus and analyze the difference between men and women. **Methods** The polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) was used to detect estrogen receptor(ER) genotype in 104 type 2 diabetic patients and 60 normal controls. Bone mineral density (BMD) of lumbar vertebrae (L₂-L₄) and upper part of femur (neck, Ward's triangle and trochanter) were measured by dual X-ray absorptiometry (DEXA). At the same time, estradiol, testosterone, fasting insulin and HbA_{1c} were measured. **Results** Multiple stepwise regression analysis showed that the BMD of lumbar vertebrae (L₂-L₄), neck of femur and Ward's triangle was associated significantly with the polymorphism of ER gene, serum estradiol, testosterone and fasting insulin in diabetes mellitus ($P < 0.01, 0.05, 0.05$, respectively), and a significant correlation was found between body mass index (BMI) and BMD of L₃-L₄ in diabetic patients. There was also a significant correlation between the polymorphism of ER gene and BMD of lumbar vertebrae 2-4 ($P = 0.001$), femoral neck ($P = 0.001$), and Ward's triangle ($P = 0.001$) in control group. There was no significant difference in the frequency of Pvu II genotype and allele between male diabetic patients and controls; the frequency of allele in female diabetic patients was lower than that in controls while there was significant difference in frequency of X allele and genotype by Xba I. The frequency of X allele and XX genotype in diabetics was higher than that in normal controls; there was no sexual difference between the two groups. The frequency of X allele in male diabetics was higher than that in female diabetics; also there was no sexual difference between the two sexes of controls. **Conclusions** There is a significant association of bone mass of every site with polymorphism of ER gene, and p, X allele may be protective factors for bone mass. The levels of serum insulin, estradiol and testosterone also contribute to bone mass in both diabetic patients and normal controls.

【Key words】 Bone mineral density; Type 2 diabetes mellitus; Estrogen; Receptor; Polymorphism(genetics)

基金项目:山东省科委2000年基金资助项目(003130119)

作者单位:261041 山东,潍坊市人民医院内分泌科(柳林);青岛市内分泌糖尿病研究所(董砚虎、司元国、曲宁)

骨质疏松是糖尿病慢性相关疾病之一,其发生与遗传、环境等因素有关。研究证实,ER基因是骨质疏松的候选基因,在骨质疏松发病中起重要作用^[1]。本研究以2型糖尿病患者为研究对象,探讨ER基因多态性与2型糖尿病骨量的关系。

材料和方法

1. 对象和分组

本研究中所有受试者均为山东人,分为糖尿病组和健康对照组2组:①糖尿病组选自我院内分泌科住院2型糖尿病患者104例,其中男39例,女65例,年龄在20~45岁,平均(43.1±2.23)岁,病程6个月~10年,平均(3.64±1.23)年。②糖尿病的诊断依据1999年WHO标准,并排除重度吸烟(>10支/d);嗜酒;原发性心、肝、性腺、甲状腺、甲状旁腺疾患;肾功能损害(尿肌酐≥110 μmol/L,尿白蛋白≥30 mg/24 h);软骨病、多发性骨髓瘤性小管酸中毒;感染、酮症等急性并发症;服用影响骨代谢药物等。③健康对照组为我院体检健康成人60例,男性26例,女性34例,年龄在24~46岁之间,平均(40.8±10.1)岁,经检查除外影响骨代谢的疾病或因素。

2. 方法

(1)临床及生化指标检测:①所有受试者均测量身高、体重,计算体重指数(BMI);②禁食12 h,次晨采肘静脉血3 ml,分离血清,液氮保存同批待测:HbA_{1c}测定用微柱法;胰岛素(Ins)、雌二醇(E₂)、睾酮(T)测定用放免法,Ins试剂盒购自DPC公司;E₂、T试剂盒购自北京北免东雅生物技术研究所。

(2)骨密度测定:采用双能X线骨密度仪(法国DMS公司, challenger型)。受试者取仰卧位测前后位腰椎(L₂~L₄)及左侧股骨近端(股骨颈、大转子、Ward's三角区)骨密度(以g/cm²表示),精确度在腰椎正位为0.5%~0.8%。峰值骨量参照亚洲人峰值骨量标准,判断标准参照1994年WHO标准。

(3)ER基因型检测:①全血DNA抽提:2%EDTA抗凝(1:0.2)全血300 μl,用Promega公司全血DNA抽提试剂盒,抽提基因组DNA,溶于60 μl TE中,-20℃保存。②引物设计与合成参照文献^[2]:上游引物5'-CTGCCACCCTATCTGTATCTTTTCCTATTCTCC-3', 下游引物:5'-TCTTTCTCTGCCAC-

CCTGGCGTCGATTA-TCTGA-3',由北京赛百盛生物工程公司合成。③PCR反应:取基因组DNA 1.1 μl(约200 ng),下游、上游引物各20 pmol, KCl 50 mmol, Tris-HCl 10mmol(pH 9), MgCl₂ 2.5 mmol, dNTP各200 μmol, Taq DNA Polymerase 0.5 U, 总体系30 μl。除引物外,均为promega公司产品。循环条件为94℃变性45 s, 61℃退火45 s, 72℃延伸70 s, 35个循环后, 72℃延伸5 min。取产物10 μl经1.5%琼脂糖凝胶电泳(溴化乙锭染色),紫外灯下观察。④限制性内切酶酶切:分别取PCR扩增产物5 μl, 加用2.5 U *vu* II或2.5 U *Xba* I, 37℃水浴保温2 h。反应终止后,产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,凝胶图像分析系统(美国阿尔法公司)下分析。基因型判定参照文献^[2]。缺乏相应酶切位点为PP型(1300 bp)和XX型(1300 bp), Pp(1300bp, 850bp, 450bp)和Xx(1300bp, 910bp, 390bp)为杂合子, pp(850bp, 450bp)和xx(910bp, 390bp)代表存在相应酶切位点的基因型。

3. 统计学处理

采用SPSS10.0统计软件。正态分布资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组组间比较用方差分析,两两比较用student's *t*检验。组间基因型构成比、等位基因频率的比较用 χ^2 检查。检验水准*P*定为0.05。

结 果

1. 骨量减少或骨质疏松发生率的比较

2型糖尿病组骨质疏松或骨量减少的发生率显著高于健康对照组(*P*<0.05),结合本组资料总体分析,女性2型糖尿病骨质疏松或骨量减少的发生率显著高于男性2型糖尿病患者(*P*<0.05),健康对照组男女性骨量减少或骨质疏松的发生率差异无显著性(*P*>0.05),见表1。

2. 健康人与2型糖尿病患者一般临床资料比较

本研究共收集2型糖尿病患者104例和健康人60例,两组年龄、性别差异无显著性,糖尿病患者HbA_{1c}水平、BMI显著高于健康人(*P*<0.05);男性患者与健康男性血清E₂均显著低于女性, T显著高于女性(*P*<0.01);两组人群空腹胰岛素水平及各部位骨密度均值均差异无显著性(*P*>0.05),见表2。

表1 糖尿病患者与健康人骨量减少或骨质疏松发生率的比较

| 项目 | 2型糖尿病 | | | 健康对照组 | | |
|------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 男性 | 女性 | 合计 | 男性 | 女性 | 合计 |
| 骨质疏松 | 1(2.56) | 3(4.62)* | 4(3.85) | 1(3.85) | 1(2.94) | 2(3.33) |
| 骨量减少 | 15(38.46) | 29(44.61)* | 44(42.31) | 5(19.23) | 7(20.58) | 12(20) |
| 骨量正常 | 23(58.97) | 33(50.76) | 56(53.85) | 20(76.92) | 26(76.47) | 46(76.67) |
| 合计 | 39 | 65 | 104 | 26 | 34 | 60 |

注: χ^2 值为 44.361, $P < 0.01$; 与男性比较 * $P < 0.05$; 括号内数字为发生率

表2 健康人与2型糖尿病患者临床及生化特征

| 项目 | 2型糖尿病 | | 健康对照组 | |
|---------------------------|---------------------------|---------------|---------------------------|---------------|
| | 男性 | 女性 | 男性 | 女性 |
| 例数(n) | 39 | 65 | 26 | 34 |
| 年龄(岁) | 44.61 ± 8.2 | 45.2 ± 6.3 | 40.8 ± 7.1 | 42.1 ± 6.7 |
| 病程(年) | 5.0 ± 4.2 | 6.9 ± 2.9 | / | / |
| 体重指数(kg/m ²) | 26.9 ± 4.1* | 27.3 ± 3.6* | 23.9 ± 2.8 | 24.1 ± 3.6 |
| 糖化血红蛋白(%) | 9.61 ± 1.10* | 9.86 ± 2.69* | 4.81 ± 1.38 | 5.21 ± 0.96 |
| 空腹胰岛素(μU/ml) | 15.26 ± 3.37 | 16.13 ± 3.37 | 16.44 ± 2.39 | 16.88 ± 2.53 |
| 骨密度均值(g/cm ²) | | | | |
| 第2腰椎 | 0.896 ± 0.11 | 0.905 ± 0.10 | 0.912 ± 0.26 | 0.921 ± 0.17 |
| 第3腰椎 | 0.901 ± 0.12 | 0.948 ± 0.09 | 0.926 ± 0.13 | 0.908 ± 0.18 |
| 第4腰椎 | 0.922 ± 0.13 | 0.897 ± 0.10 | 0.901 ± 0.11 | 0.912 ± 0.13 |
| 股骨颈 | 0.931 ± 0.12 | 0.911 ± 0.11 | 0.923 ± 0.15 | 0.913 ± 0.14 |
| 大转子 | 0.918 ± 0.13 | 0.917 ± 0.14 | 0.908 ± 0.18 | 0.927 ± 0.14 |
| Ward's 三角区 | 0.897 ± 0.13 | 0.902 ± 0.14 | 0.907 ± 0.34 | 0.911 ± 0.09 |
| 雌二醇(pg/ml) | 8.66 ± 1.45 [△] | 52.66 ± 11.65 | 7.96 ± 1.85 [△] | 51.43 ± 10.26 |
| 睾酮 | 24.39 ± 5.85 [△] | 2.36 ± 1.05 | 25.76 ± 8.45 [△] | 2.69 ± 1.25 |

注: 与健康对照组比较 * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$; 与女性比较[△] $P < 0.01$

3. ER 基因多态的 PCR 及酶切结果

ER 基因组 DNA PCR 扩增目的片段长 1300 bp。经 Pvu II 酶切结果如下: 1 为纯合子 pp(850 bp, 450 bp), 2、3 为纯合子 PP(1300 bp), 4~8 为杂合子 Pp(1300 bp, 850 bp, 450 bp)。经 Xba I 酶切结果如下: 1~6 为杂合子 Xx(1300 bp, 910 bp, 390 bp), 7、8、10 为纯合子 xx(910 bp, 390 bp), 9 为纯合子 XX(1300 bp)。两端为 100 bp DNA ladder 作为分子量标志。

4. ER 基因多态性与性别的关系

Pvu II 酶切基因型: 男性两组间基因型频率、等位基因频率差异均无显著性; 女性两组间基因型频率存在差异, 2 型糖尿病患者 PP、Pp 基因型频率均

显著高于对照组, pp 基因型频率显著低于对照组, 女性两组等位基因频率差异显著, 对照组 P 等位基因频率低于 2 型糖尿病患者, p 等位基因频率高于 2 型糖尿病患者。

Xba I 酶切基因型: 2 型糖尿病患者与对照组基因型频率差异显著, 无论男女, 对照组 XX 基因型频率高, xx 基因型频率低于 2 型糖尿病患者; Xx 基因型频率无差异。两组等位基因频率亦存在显著差异, 无论男女, 对照组 X 等位基因频率均显著高于 2 型糖尿病患者, x 等位基因频率低于 2 型糖尿病患者。2 型糖尿病组男性 X 等位基因频率高于女性, 对照组 X 等位基因频率无性别差异, 见表 3。

表3 ER 基因 Pvu II 与 Xba I 酶切基因型分布与性别的关系

| 组别 | n | 男 | | | | | 女 | | | | |
|------|-----|----------|-----------|----------|--------|--------|----------|-----------|-----------|--------|--------|
| | | 基因型 | | | 等位基因频率 | | 基因型 | | | 等位基因频率 | |
| | | PP | Pp | pp | P | p | PP | Pp | pp | P | p |
| T2DM | 104 | 7(17.95) | 23(58.97) | 9(23.08) | 0.4744 | 0.5256 | 9(13.85) | 40(61.54) | 16(24.62) | 0.4462 | 0.5538 |
| 对照组 | 60 | 5(19.23) | 13(50.0) | 8(30.77) | 0.4423 | 0.5527 | 2(5.88) | 13(38.24) | 19(55.88) | 0.25 | 0.75 |

| 组别 | 男 | | | | | 女 | | | | |
|------|-----------|------------|----------|--------|--------|------------|------------|------------|--------|--------|
| | 基因型 | | | 等位基因频率 | | 基因型 | | | 等位基因频率 | |
| | Xx | Xx | xx | X | x | XX | Xx | xx | X | x |
| T2DM | 3(7.69%) | 33(84.62%) | 3(7.69%) | 0.50 | 0.50 | 8(12.31%) | 40(61.54%) | 17(26.15%) | 0.4308 | 0.5692 |
| 对照组 | 8(30.77%) | 18(69.23%) | 0(0%) | 0.6558 | 0.3442 | 13(38.24%) | 20(58.82%) | 1(2.84%) | 0.6764 | 0.3236 |

注: Pvu II 酶切基因型: 男性 T2DM 与对照组比较, $\chi^2 = 0.08, P > 0.05$; 女性 T2DM 与对照组比较, $\chi^2 = 9.48, P < 0.05$; 等位基因频率: 男性 T2DM 与对照组比较, $\chi^2 = 0.07, P < 0.05$; 女性 T2DM 与对照组比较, $\chi^2 = 10.83, P < 0.01$ 。Xba I 酶切基因型: 男性 T2DM 与对照组比较, $\chi^2 = 10.12, P < 0.01$; 女性 T2DM 与对照组比较, $\chi^2 = 9.14, P < 0.05$, 等位基因频率: 男性 T2DM 与对照组比较, $\chi^2 = 12.31, P < 0.01$; 女性 T2DM 与对照组比较, $\chi^2 = 10.64, P < 0.01$, 括号内数字为百分率

5. ER 基因型与骨密度的关系

分析后发现: 相同基因型的对照组、糖尿病患者在不同部位 BMD 值均有差别, 其中以 Ward's 三角区骨密度最低, 与其他部位比较差异显著 ($P < 0.05$); 相同部位不同基因型的 BMD 值有差别, 分析后均显示: p 及 X 等位基因携带者, 骨密度相对较高, 而 P、x

等位基因携带者, 骨密度相对较低, 表现为 PP、Pp 型与 xx 型个体分别较 pp 型组与 XX、Xx 型个体骨密度低。糖尿病组 PPXX 型 1 例, 统计时弃去; 对照组 xx 基因型仅 1 例, 由此产生 ppXX 型 1 例, 统计时弃去, PPXX 型 3 例, PPXx 型 4 例, 统计时合并分析 (表 4, 5)。

表 4 健康人不同 ER 基因型间骨密度的比较 ($g/cm^2, \bar{x} \pm s$)

| 基因型 | n | L ₂ | L ₃ | L ₄ | Neck | Ward's | G.T |
|---------|----|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| PP | 7 | 0.722 ± 0.12 | 0.781 ± 0.15 | 0.794 ± 0.12 | 0.792 ± 0.12 | 0.738 ± 0.15 [△] | 0.751 ± 0.12 |
| Pp | 26 | 0.796 ± 0.11 | 0.836 ± 0.12 | 0.846 ± 0.13 | 0.832 ± 0.12 | 0.780 ± 0.13 ^{△*} | 0.814 ± 0.13 |
| Pp | 27 | 0.925 ± 0.10* | 0.958 ± 0.09* | 0.961 ± 0.10* | 0.910 ± 0.11* | 0.834 ± 0.16 [△] | 0.871 ± 0.14* |
| XX | 21 | 0.865 ± 0.14 | 0.906 ± 0.12 | 0.908 ± 0.13 | 0.871 ± 0.10 | 0.844 ± 0.12 [△] | 0.839 ± 0.13 |
| Xx | 38 | 0.842 ± 0.12 | 0.884 ± 0.13 | 0.891 ± 0.13 | 0.871 ± 0.11 | 0.805 ± 0.13 [△] | 0.846 ± 0.13 |
| PPXX(x) | 7 | 0.869 ± 0.15 | 0.899 ± 0.17 | 0.901 ± 0.11 | 0.913 ± 0.13 | 0.905 ± 0.31 [△] | 0.873 ± 0.11 |
| PpXX | 9 | 0.832 ± 0.14 | 0.893 ± 0.21 | 0.891 ± 0.11 | 0.868 ± 0.07 | 0.855 ± 0.12 [△] | 0.875 ± 0.10 |
| PpXx | 15 | 0.861 ± 0.16 | 0.909 ± 0.11 | 0.906 ± 0.13 | 0.913 ± 0.11 | 0.886 ± 0.12 [△] | 0.906 ± 0.13 |
| ppXX | 9 | 1.001 ± 0.12* | 1.014 ± 0.10* | 1.003 ± 0.12* | 0.996 ± 0.13* | 0.837 ± 0.14* [△] | 0.921 ± 0.17* |
| ppXx | 19 | 0.933 ± 0.10* [△] | 0.963 ± 0.10* [△] | 0.971 ± 0.10* [△] | 0.921 ± 0.14* [△] | 0.839 ± 0.15* [△] | 0.965 ± 0.11* [△] |

注: 与其他基因型比较 * $P < 0.01, ^\Delta P < 0.01$; 与其他部位比较 $^\Delta P < 0.05$

表 5 糖尿病患者不同 ER 基因型间骨密度的比较 ($g/cm^2, \bar{x} \pm s$)

| 基因型 | L ₂ | L ₃ | L ₄ | Neck | Ward's | G.T |
|----------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| PP(25) | 0.722 ± 0.12 | 0.781 ± 0.15 | 0.794 ± 0.12 | 0.792 ± 0.12 | 0.738 ± 0.15 [△] | 0.751 ± 0.12 |
| Pp(77) | 0.796 ± 0.11 | 0.836 ± 0.12 | 0.846 ± 0.13 | 0.832 ± 0.12 | 0.780 ± 0.13 [△] | 0.814 ± 0.13 |
| pp(38) | 0.925 ± 0.10* | 0.958 ± 0.09* | 0.961 ± 0.10* | 0.910 ± 0.11* | 0.834 ± 0.16* [△] | 0.871 ± 0.14* |
| XX(12) | 0.865 ± 0.14 | 0.906 ± 0.12 | 0.908 ± 0.13 | 0.871 ± 0.10 | 0.844 ± 0.12 [△] | 0.839 ± 0.13 |
| Xx(99) | 0.842 ± 0.12 | 0.884 ± 0.13 | 0.891 ± 0.13 | 0.871 ± 0.11 | 0.805 ± 0.13 [△] | 0.846 ± 0.13 |
| xx(29) | 0.708 ± 0.11 | 0.744 ± 0.10 | 0.766 ± 0.11 | 0.736 ± 0.13 | 0.662 ± 0.13 [△] | 0.698 ± 0.13 |
| PPXx(14) | 0.701 ± 0.13 | 0.747 ± 0.11 | 0.771 ± 0.13 | 0.785 ± 0.10 | 0.740 ± 0.11 [△] | 0.747 ± 0.11 |
| PPxx(10) | 0.651 ± 0.09 | 0.713 ± 0.11 | 0.755 ± 0.12 | 0.718 ± 0.12 | 0.612 ± 0.15 [△] | 0.677 ± 0.13 |
| PpXX(8) | 0.793 ± 0.11 | 0.835 ± 0.14 | 0.830 ± 0.11 | 0.828 ± 0.07 | 0.766 ± 0.14 [△] | 0.787 ± 0.13 |
| PpXx(54) | 0.799 ± 0.10 | 0.835 ± 0.11 | 0.856 ± 0.13 | 0.837 ± 0.11 | 0.766 ± 0.12 [△] | 0.814 ± 0.13 |
| Ppxx(15) | 0.711 ± 0.12 | 0.742 ± 0.11 | 0.744 ± 0.13 | 0.720 ± 0.15 | 0.685 ± 0.16 [△] | 0.693 ± 0.14 |
| ppXX(5) | 0.879 ± 0.12 [△] | 0.901 ± 0.10* | 0.955 ± 0.16* | 0.8930.18* | 0.845 ± 0.17* [△] | 0.865 ± 0.17* [△] |
| ppXx(29) | 0.917 ± 0.10* [△] | 0.962 ± 0.10* [△] | 0.955 ± 0.10* [△] | 0.920 ± 0.14* [△] | 0.797 ± 0.16* [△] | 0.870 ± 0.11* [△] |
| ppxx(4) | 0.805 ± 0.13 | 0.816 ± 0.11 | 0.864 ± 0.14 | 0.764 ± 0.14 | 0.618 ± 0.22 [△] | 0.698 ± 0.15 |

注: 与其他基因型比较 * $P < 0.01, ^\Delta P < 0.01$; 与其他部位比较 $^\Delta P < 0.05$

6. 不同因素对骨密度的影响

逐步多元回归分析发现: ①糖尿病患者与对照组腰椎、股骨颈、Ward's 三角区骨密度均与基因型显著相关 ($P = 0.001$)。②糖尿病患者各单位骨密度

均与胰岛素水平显著相关 ($L_2 P = 0.041, L_3 P = 0.039, L_4 P = 0.009$, 股骨颈 $P = 0.01$, Ward's 三角 $P = 0.027$, 大转子 $P = 0.042$), 第 2, 3 腰椎骨密度与 BMI 显著相关 ($P = 0.01, 0.05$), 见表 6、7。

表6 2型糖尿病患者骨密度影响因素逐步多元回归分析

| 变异 | 标准偏回归系数(/标准差) | | | | | |
|----------------|----------------|----------------|----------------|--------------|--------------|--------------|
| | L ₂ | L ₃ | L ₄ | Neck | Ward's | Troch |
| Bba I | 0.244(0.013) | 0.261(0.014) | 0.220(0.015) | 0.253(0.014) | 0.320(0.017) | 0.012(0.036) |
| | P = 0.001 | P = 0.001 | P = 0.001 | P = 0.001 | P = 0.001 | P = 0.1023 |
| Pvu II | 0.503(0.011) | 0.433(0.012) | 0.406(0.013) | 0.304(0.012) | 0.175(0.014) | 0.008(0.006) |
| | P = 0.001 | P = 0.001 | P = 0.001 | P = 0.001 | P = 0.001 | P = 0.1425 |
| BMI | 0.103(0.010) | 0.245(0.013) | 0.236(0.024) | 0.179(0.017) | 0.188(0.021) | 0.203(0.016) |
| | P = 0.121 | P = 0.01 | P = 0.05 | P = 0.108 | P = 0.094 | P = 0.076 |
| Ins | 0.201(0.027) | 0.226(0.036) | 0.264(0.032) | 0.247(0.042) | 0.197(0.037) | 0.211(0.029) |
| | P = 0.041 | P = 0.039 | P = 0.009 | P = 0.01 | P = 0.027 | P = 0.042 |
| E ₂ | 0.315(0.0147) | 0.274(0.013) | 0.296(0.037) | 0.285(0.029) | 0.219(0.017) | 0.211(0.029) |
| | P = 0.021 | P = 0.033 | P = 0.032 | P = 0.033 | P = 0.044 | P = 0.045 |
| T | 0.277(0.011) | 0.262(0.022) | 0.214(0.017) | 0.256(0.029) | 0.197(0.031) | 0.187(0.042) |
| | P = 0.022 | P = 0.021 | P = 0.03 | P = 0.023 | P = 0.031 | P = 0.05 |

表7 健康对照组骨密度影响因素逐步多元回归分析

| 变异 | 标准偏回归系数(/标准差) | | | | | |
|----------------|----------------|----------------|----------------|--------------|--------------|--------------|
| | L ₂ | L ₃ | L ₄ | Neck | Ward's | Troch |
| Xba I | 0.213(0.017) | 0.206(0.011) | 0.212(0.015) | 0.233(0.013) | 0.366(0.015) | 0.011(0.016) |
| | P = 0.001 | P = 0.001 | P = 0.001 | P = 0.001 | P = 0.001 | P = 0.083 |
| Pvu II | 0.484(0.016) | 0.501(0.014) | 0.427(0.013) | 0.382(0.012) | 0.422(0.019) | 0.018(0.006) |
| | P = 0.001 | P = 0.001 | P = 0.001 | P = 0.001 | P = 0.001 | P = 0.1063 |
| E ₂ | 0.315(0.0147) | 0.274(0.013) | 0.296(0.037) | 0.285(0.029) | 0.219(0.017) | 0.211(0.029) |
| | P = 0.021 | P = 0.033 | P = 0.032 | P = 0.033 | P = 0.044 | P = 0.045 |
| T | 0.277(0.011) | 0.2625(0.022) | 0.214(0.017) | 0.256(0.029) | 0.197(0.031) | 0.187(0.042) |
| | P = 0.022 | P = 0.021 | P = 0.03 | P = 0.023 | P = 0.031 | P = 0.05 |

讨 论

骨质疏松的发生与遗传、环境等因素共同作用有关^[3]。ER 基因敲除小鼠(ERKO)模型的建立和 ER 基因突变病例的发现,以及 ER 基因变异对绝经后妇女骨质疏松发生率影响均提示 ER 基因在骨质疏松发病中起重要作用。ER 基因定位于染色体 6q25.1 上,由 8 个内含子和 7 个外显子组成。研究证实 ER 基因有 2 种多态性与骨代谢相关,但国内外目前对 ER 基因与骨质疏松的关系的结论不一, Kabayahi 对日本绝经后妇女研究认为 PP 基因型 BMD 低, XX 基因型 BMD 高, Willing 对美国妇女, Mahonen 对芬兰妇女, Qi 对澳大利亚男女性研究均提示 pp 基因型个体 BMD 低; Lau 等^[4]报道香港妇女 XX 基因型者 BMD 高。本研究发现,2 型糖尿病患者骨密度与 ER 基因多态性密切相关,还与 BMI、胰岛素、性激素水平等因素有关,对照组骨密度只受基因型与性激素影响。

本研究发现,所有受试者 p、X 等位基因携带者常骨密度较高,而 P、x 等位基因携带者骨密度较低,与国内报告结论一致^[5]。研究还发现,对应于 Pvu

II 酶切位点的 ER 基因多态分布存在性别差异,女性糖尿病患者 p 等位基因频率低于健康人,男性糖尿病患者 X 等位基因频率高于女性糖尿病患者,由此可部分的解释本研究中女性糖尿病患者骨质疏松或骨量减少的发生率高于男性的原因,由于样本例数和来源关系,有待进一步探讨。

ER 基因多态性影响骨代谢机制可能是:由于 Pvu II 和 Xba I 位点均位于内含子 1 上,内含子的多态性可通过与外显子突变连锁引起 ER 蛋白功能改变,或与其他内含子或调节单元突变连锁而通过转录调节影响表达蛋白水平;还可通过与邻近的其他影响骨代谢的基因突变连锁直接或间接引起骨密度下降^[2]。或与其他影响骨代谢的基因相关联,共同作用影响骨代谢。

骨量主要受遗传因素影响,但非遗传因素及与遗传因素相互作用共同决定骨量^[3]。多元回归分析发现,雌二醇与睾酮均进入方程,说明其对骨密度均具有影响作用,这是由于生理水平的雌激素即可抑制甲状旁腺激素的骨吸收活性,对于男女性骨骼的发育和骨量的维持均必不可少^[6]。雄激素对骨量的

(下转第 438 页)

降是引起骨密度下降并导致骨质疏松的主要原因。本研究显示 17- α 雌二醇具有促进成骨细胞样细胞生长并分泌碱性磷酸酶,提高骨钙水平的作用。由于 17- α 雌二醇不具有雌激素样作用,这使它将不仅可用于女性的绝经后骨质疏松症的治疗,还将可能用于男性的骨质疏松症及相关疾病的治疗和预防。

因此,17- α 雌二醇的研究在骨量丢失的预防以及骨质疏松症的治疗方面显示了潜力。本实验为这方面的进一步研究提供了实验依据。实验所初步证实的 17- α 雌二醇所具有的在体外促进成骨细胞样细胞增殖及促进骨形成的生理作用,对促进局部成骨细胞增殖作用,骨的形成和重塑,预防骨质疏松症的发生,加强骨折的愈合有着积极意义。可以此为先导化合物,进行以基于 17- α 、 β 雌激素类化合物与体内大分子之间的严格手性匹配与分子识别的结构改造;或者以此为工具药,进行以雌激素受体及其亚型为主的深入的药理实验,将有可能发现新的雌激素受体及其亚型,促进新的高效低毒的骨质疏松预防和治疗药物的研究。

参 考 文 献

- Bain SD, Baily MC, Celino DL, et al. High-dose estrogen inhibits bone resorption and stimulates bone formation in the ovariectomized mouse. *J Bone Miner Res*, 1993; 8: 435-442.
- Kaplan BS, Terpening CM, Benz DJ. Estrogen binding receptor mRNA and biological response in osteoblast-like osteosarcoma cells. *Science*, 1988; 241: 81-84.
- Lotz W. Biological activities and receptor affinities of some natural and synthetic oestrogens and their D-homo analogues. *Specialia*, 15 (15): 1373-1377.
- Tsutomu Nishihara. Estrogenic activity of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. *Journal of Health Science*, 2000, 46 (4): 282-298.
- Dittrich R. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1999, 107: 53-57.
- Connerty HV, Briggs AR. Determination of serum calcium by means of orthocrocin complexone. *Am J Clin Pathol*, 1966, 45: 290-294.
- Huo B, Dossing DA, Dimuzio MT, et al. Generation and characterization of a human osteosarcoma cells line stably transfected with the human estrogen receptor gene. *J Bone Miner Res*, 1995, 10: 769-774.
- Watts CKW, King RJB. Overexpression of estrogen receptor in HTB96 human osteosarcoma cells results in estrogen-induced growth inhibition and receptor cross talk. *J Bone Miner Res*, 1994, 138: 2919-2925.
- Caplan AL, Pechak DG. The cellular and molecular embryology of bone formation. In: Peck C, ed. *Bone and mineral research (Vol 5)* Amsterdam: Elsevier, 1987, 117-183.

(收稿日期:2003-10-23)

(上接第 470 页)

影响与睾酮可在周围组织中转化为雌激素维持骨量有关^[7]。

糖尿病骨量的改变取决于峰值骨量及其后的骨量丢失,高糖状态易引起渗透性利尿,钙、磷、镁排泄增多,肾小管对钙磷等重吸收减少,肠道钙磷吸收减少,故糖尿病患者易发生骨质疏松。但本研究中本组 2 型糖尿病患者骨密度与对照组差别不大,可能由于 2 型糖尿病多 40 岁以后起病,骨形成率降低则可延缓年龄相关性骨丢失,且 2 型糖尿病常伴有肥胖、高胰岛素血症,使骨形成、骨量增加,骨骼应力增加,而且,脂肪组织具有转化为性激素维持骨量的作用^[7]。但糖尿病状态下骨吸收大于骨形成,又可导致骨量净丢失增加,故 2 型糖尿病骨量可表现为正常、增高或降低^[8]。

我们还发现 2 型糖尿病患者 BMI 高于对照组,多元回归分析后显示, BMI 与腰椎 3、4 骨密度显著相关 ($P = 0.01$),可能也与肥胖、高胰岛素血症,使骨骼应力和骨形成增加有关,与 Willing 等^[9]报道 BMI 可影响 BMD 的结论一致。

参 考 文 献

- Kobayashi S, Inoue S, Hosoi T, et al. Association of bone mineral density with the polymorphism of estrogen receptor gene. *J Bone Miner Res*, 1996, 11: 306-311.
- Bagger YZ, Jorgensen HL, Heegaard AM, et al. No major effect of estrogen receptor gene polymorphism on bone mineral density or bone loss in postmenopausal Danish women. *Bone*, 2000, 26: 111-116.
- Giguere Y, Rousseau F. The genetics of osteoporosis: complexities and difficulties. *Clin Genet*, 2000, 57: 161-169.
- Lau EM, Young RP, Lam V, et al. Estrogen receptor gene polymorphisms and bone mineral density in postmenopausal Chinese women. *Bone*, 2001, 29: 96-98.
- 黄琪仁, 王钦红, 张良平, 等. 绝经后健康妇女雌激素受体基因多态性与骨密度关系的研究. *中国骨质疏松杂志*, 1998, 4: 38-41.
- 安胜军, 李恩. 骨代谢过程中雌激素的作用及其与细胞因子的关系. *国外医学生理、病理科学与临床分册*, 1999, 19: 273-275.
- 车琦, 周智广. 糖尿病的骨量改变及其机理. *中国糖尿病杂志*, 1998, 6: 171-173.
- Thomas DM, Ng KM, Best JD. Insulin and bone: a clinical scientific review. *Endocrinol Metab*, 1997, 4: 5-17.
- Willing M, Sowers M, Aron D, et al. Bone mineral density and its change in white women: estrogen and vitamin D receptor genotypes and their interaction. *J Bone Miner Res*, 1998, 13: 695-705.

(收稿日期:2003-04-15)