

北京、武汉、福建原发性骨质疏松症 VDR I、VDR II-1、VDR II-2 基因单核苷酸多态性研究

谢雁鸣 胡松年 韩华 寇秋爱 高蕊 杜宝俊

摘要: **目的** 寻找骨质疏松相关基因的单核苷酸多态性位点(SNP),研究正常人群与骨质疏松患者,以及不同地区患者之间的 SNP 位点的差异。**方法** 应用人类基因组学的方法,对北京、武汉、福建三个地域的 417 例被诊断为原发性骨质疏松症的患者(骨质疏松组其中北京组 236 例,武汉组 123 例,福建组 61 例)和 60 例正常人(对照组),进行了骨质疏松相关基因单核苷酸多态性比较研究。**结果** 对对照组与骨质疏松患者组进行 χ^2 分析,VDR I 基因型总体水平比较差异无显著性;CC 与 TT、CC 与 CT、及 TT 与 CT 基因型比较差异均无显著性。VDR II-1 基因型总体水平比较,及 CC 与 TT、CC 与 CT 基因型比较差异均有非常显著性;TT 与 CT 基因型比较差异无显著性。VDR II-2 基因型总体水平比较,及 CC 与 TT、CC 与 CT、TT 与 CT 基因型比较差异均无显著性。北京、武汉、福建三地区的 VDR I 基因型总体水平,对照组与北京组、北京组与武汉组比较差异均有显著性;北京组与福建组、武汉组与福建组比较差异无显著性。VDR II-1 基因型总体水平,对照组与武汉组、对照组与福建组比较差异均有显著性;对照组与北京组、北京组与武汉组、北京组与福建组及武汉组与福建组比较差异无显著性。VDR II-2 基因型总体水平,北京组与武汉组、北京组与福建组及武汉组与福建组比较差异均无显著性。**结论** 本实验研究涉及的 VDR I、VDR II-1、VDR II-2 基因研究中,VDR I、VDR II-1 对照组与原发性骨质疏松症基因的 SNP 位点差异有显著性。地区的差异主要表现在北京与武汉,未发现 VDR II-2 基因的该 SNP 位点与中国人骨质疏松症有关。

关键词: 原发性骨质疏松症; SNP; VDR I 基因; VDR II-1 基因; VDR II-2 基因

骨质疏松是一种多基因疾病,绝经、年龄、性别、种族、吸烟、饮食、药物、锻炼、内分泌疾病等均可影响骨代谢^[1],一般分为遗传因素和环境因素。从遗传角度讲,骨质密度是由多个基因控制的。维生素 D 受体(VDR)基因、雌性激素受体(ER)基因、降钙素受体(CTR)基因、骨钙素受体(BGPR)基因、胶原蛋白(COL)基因、转移生长因子- β (TGF- β)基因等是近年来研究较多的基因。许多科学家对不同地区、不同人种进行了大量研究,虽然结果大相径庭^[2],但没有一人否认以上基因与骨质疏松有关。大部分专家认为骨质疏松受多个基因的调控作用,而且环境条件、个体的具体因素影响基因的表达式。这些研究绝大部分利用了限制性片段长度多态性(restrict fragment

length polymorphism, RFLP)的方法,其中 VDR 基因主要涉及到 Bsm I、Apa I、Taq I 酶切位点。RFLP 研究的原理是用限制性内切酶特异性切割 DNA 链。由于酶切通常只产生 2 到 3 个片段,可提供的信息量有限,而且酶切反应受到 DNA 样品纯度等多种因素影响,具有模糊性;而单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)的研究是基于基因组学迅速发展起来的第 3 代标记物^[3],它直接对相关基因的一部分片段进行测序并找到 SNP 位点,有明确的碱基序列,直接反映基因型与表现型的关系;且每 100~300 个碱基就有一个 SNP 位点,大多数基因的变化都有归于单核苷酸突变,所以有利于查找致病基因,尤其适用于复杂基因调控的疾病研究。随着大规模测序的发展,大量物种 DNA 序列的逐渐公布,SNP 技术已越来越受人重视,成为遗传病分析的重要手段,为基因治疗提供了基础。这是 RFLP 无法媲美的。

本研究旨在寻找骨质疏松相关基因的单核苷

作者单位:100091 北京,中国中医研究院西苑医院(谢雁鸣、寇秋爱、高蕊、杜宝俊);中国科学院遗传所华大基因研究中心(胡松年、韩华)

通讯作者:谢雁鸣,Email: caigog4408@sohu.com

酸多态性位点(SNP),研究正常人群与骨质疏松患者,以及不同地区患者之间的SNP位点的差异。涉及的骨质疏松相关基因——维生素D受体(VDR)基因——包括2对引物,均位于第7号外显子与第9号外显子之间^[2,4],后者有2个SNP位点,故VDR共涉及3个SNP位点(标记为VDR I, VDR II-1, VDR II-2)。

1 材料和方法

1.1 研究对象 480例,选自全国各地健康人群及武汉、北京、福建三个地区的原发性骨质疏松患者。

1.2 主要仪器

离心机:Centrifuge 5417R 5810R(美国Eppendorf公司),台式离心机TGL-16G(上海安亭科学仪器厂),手掌型离心机LX-100(江苏海门市麒麟医用仪器厂),电泳仪、电泳槽(北京市六一仪器厂),旋涡混合器QL-901(江苏海门市麒麟医用仪器厂),PCR仪PTC-100(美国MJ Research公司),384 PCR产物抽滤纯化成套设施S384PCR 50(美国Millipore公司),377自动测序仪(美国PE公司)。

1.3 主要试剂:TES缓冲液(pH 8.0)(美国Life Technologies公司),酚/氯仿抽提液:酚/氯仿(1:1)(原平皓生物技术公司),乙酸钠溶液(3 mol/L, pH 4.8;批号:950718,北京化工厂),蛋白酶K:20 mg/ml(德国MERCK公司),70%酒精,无水乙醇,氯仿(北京化工厂),电泳液:1×TAE(40 mmol/L, Tris-乙酸, 1 mmol/L EDTA),Taq DNA聚合酶(华美生物工程公司),BigDye(美国PE公司)。

1.4 操作步骤

基因组DNA的提取:取-80℃冷冻的血样逐步溶解至室温,吸取500 μl至Eppendorf管中;加等体积水破红细胞,4℃,4000 rpm离心10 min,弃上清;加入等体积裂解缓冲液TES和适量蛋白酶K,50℃水浴2 h,消化蛋白;加等体积酚抽提,高速离心,吸取上清至一新离心管中;加等体积酚/氯仿抽提,高速离心,吸取上清至一新离心管中;加等体积氯仿抽提,高速离心,吸取上清至一新离心管中;加1/10体积3M NaAc,2倍体积预冷无水乙醇沉淀;TE缓冲液溶解DNA。电泳检测。

1.5 基因组DNA的特异性扩增

引物序列分别如下:VDR I引物序列:正向引物:5'-CAACCAAGACTACAAGTACCGCTCAGTGA-3';反向引物:5'-AACCAGCGGGAAGAGGTCAAGGG-3';VDR II引物序列:正向引物:5'-CAGAGCATG-

GACAGGGAGCAA-3';反向引物:5'-GCAACTCTCATGGCTGAGGTCTC-3'。

用96孔反应板做PCR扩增,体系为25 μl。10×反应缓冲液(不含MgCl),2.5 μl;MgCl溶液(25 mM),1.5 μl;4×dNTP混合物(每种2.5 mM),2 μl;引物(上游),5 pmoles;引物(下游),5 pmoles;DNA模板,0.001 pmoles。

VDR I基因的程序为:94℃,3 min;94℃,30 sec;66℃,30 sec;72℃,1 min;30个循环,72℃,5 min。VDR II基因的程序为:94℃,3 min;94℃,30 sec;66℃,30 sec;72℃,1 min;30个循环,72℃,5 min。电泳检测。

1.6 PCR产物的纯化

使用Millipore公司生产的Multiscreen384板进行抽滤纯化,操作步骤如下:将PCR产物转入Multiscreen384板中,调节真空泵压力为10 inHg,抽滤15 min;加入50 μl去离子水,混匀,抽滤15 min;重复步骤2;每孔加入20 μl水,混匀,使DNA充分溶解;将纯化的PCR产物转入新的96孔反应板中,待用。

1.7 测序反应及测序

原理为Sanger末端终止法,测序反应体系为10 μl;PCR产物,40~100 ng;5X测序缓冲液,2 μl;单向引物(10 pmol/μl),1 μl;BigDye,2 μl。

测序反应:96℃,2 min;96℃,10 sec;50℃,10 sec;60℃,4 min。35个循环。

反应产物用70%乙醇纯化2次;加Loading Buffer,4℃放置2 h以上;上样于377自动测序仪,电泳7~8 h。

2 结果

2.1 骨质疏松组与对照组的比较

本研究中对照组60例;骨质疏松组420例,其中北京236例,武汉123例,福建61例。

2.1.1 VDR I基因扩增片段为800 bp,SNP位点用反向引物测序所得,位于230 bp处左右,亦即Bsm I的RFLP位点。GAATGC突变成GAATGT,基因型分别表示为CC纯合体,CT杂合体,TT纯合体。

其中本实验对两组的VDR I基因型进行 χ^2 分析,对照组45例中CC基因型42例,CT基因型1例,TT基因型2例;骨质疏松组382例中CC基因型373例,CT基因型3例,TT基因型6例。

将对照组与骨质疏松组进行 χ^2 分析,两组的总体水平比较结果为 $\chi^2 = 2.74 (v = 4)$, $P = 0.2542$,差异无显著性。将对照组与骨质疏松组CC基因型与

TT 基因型比较, $\chi^2 = 1.87 (v = 1), P = 0.172$, 差异无显著性; CC 基因型与 CT 基因型比较, $\chi^2 = 0.95 (v = 1), P = 0.329$, 差异无显著性; TT 基因型与 CT 基因型比较, $\chi^2 = 0 (v = 1), P = 1.000$, 差异无显著性。

2.1.2 VDR II 基因扩增片段为 740 bp, VDR II-1 SNP 位点用正向引物测序所得, 位于 200 bp 处左右, 亦即 Apa I 的 RFLP 位点。GGCCC 突变成 GTGCC, 基因型分别表示为 GG 纯合体, GT 杂合体, TT 纯合体。

本实验对两组的 VDR II 其因型进行 χ^2 分析, 其中对照组 56 例中 GG 基因型 34 例, TT 基因型 6 例, GT 基因型 16 例; 骨质疏松组 295 例中 GG 基因型 240 例, TT 基因型 12 例, GT 基因型 43 例。

将对照组与骨质疏松组进行 χ^2 分析, 两组的总体水平比较结果为 $\chi^2 = 12.11 (v = 2), P = 0.002$ 差异有非常显著性。将对照组与骨质疏松组 GG 基因型与 TT 基因型比较, $\chi^2 = 4.61 (v = 1), P = 0.032$, 差异有非常显著性; GG 基因型与 GT 基因型比较, $\chi^2 = 7.12 (v = 1), P = 0.008$, 差异有非常显著性; TT 基因型与 GT 基因型比较, $\chi^2 = 0.45 (v = 1), P = 0.831$, 差异无显著性。

2.1.3 VDR II 基因扩增片段为 740 bp, VDR II-2 SNP 位点用正向引物测序所得, SNP 位点位于 300 bp 处左右, 亦即 Taq I 的 RFLP 位点。TTGA 突变成 TCGA, 基因型分别表示为 TT 纯合体, TC 杂合体, CC 纯合体。

对照组 55 例中 TT 基因型 50 例, CC 基因型 1 例, TC 基因型 4 例; 骨质疏松组 270 例中 TT 基因型 236 例, CC 基因型 3 例, TC 基因型 31 例。

将对照组进行 χ^2 分析, 两组的总体水平比较结果为 $\chi^2 = 1.00 (v = 2), P > 0.05$, 差异无显著性。将对照组与骨质疏松组 TT 基因型与 CC 基因型比较, $\chi^2 = 0 (v = 1), P > 0.05$, 差异无显著性; TT 基因型与 TC 基因型比较, $\chi^2 = 0.90 (v = 1), P > 0.05$, 差异无显著性; CC 基因型与 TC 基因型比较, $\chi^2 = 0.28 (v = 1), P > 0.05$, 差异无显著性。

2.2 不同地区骨质疏松组与对照组比较(表 1-3)

表 1 北京、武汉、福建三地区的 VDR I 基因型比较

基因型	对照组	骨质疏松组			合计
		北京	武汉	福建	
GG	42	201	115	47	363
TT	2	1	5	1	7
GT	1	0	2	0	2
合计	45	202	122	48	372

地区之间总体水平比较结果为 $\chi^2 = 9.57 (v = 4), P = 0.048$, 差异有显著性。对照组与北京组比较, $\chi^2 = 9.36, P = 0.0093$, 差异有显著性; 北京组与武汉组比较, $\chi^2 = 8.86 (v = 2), P = 0.019$, 差异有显著性; 北京组与福建组比较, $\chi^2 = 1.25 (v = 2), P > 0.05$, 差异无显著性; 武汉组与福建组比较, $\chi^2 = 1.24 (v = 2), P > 0.05$, 差异无显著性。

表 2 北京、武汉、福建三地区的 VDR II-1 基因型比较

基因型	对照组	骨质疏松组			合计
		北京	武汉	福建	
GG	35	132	66	42	240
TT	6	9	1	2	12
GT	16	32	8	3	43
合计	56	173	75	47	295

总体水平比较结果为 $\chi^2 = 18.58 (v = 4), P = 0.0049$, 差异有显著性。正常人与北京人比较, $\chi^2 = 5.06, P = 0.079$, 差异无显著性; 对照组与武汉组比较, $\chi^2 = 13.55, P = 0.0011$, 差异有显著性; 对照组与福建组比较, $\chi^2 = 10.67, P = 0.0048$, 差异有显著性; 北京组与武汉组比较, $\chi^2 = 4.83, P = 0.089$, 差异无显著性; 北京组与福建组比较, $\chi^2 = 4.27 (v = 2), P = 0.1181$, 差异无显著性; 武汉组与福建组比较, $\chi^2 = 1.60 (v = 2), P = 0.4499$, 差异无显著性。

表 3 北京、武汉、福建三地区的 VDR II-2 基因型比较

基因型	对照组	骨质疏松组			合计
		北京	武汉	福建	
TT	51	118	46	36	200
CC	2	2	1	0	3
TC	2	23	3	5	31
合计	55	143	50	41	234

地区之间总体水平比较结果为 $\chi^2 = 9.61 (v = 4), P = 0.1420$, 差异无显著性。北京组与武汉组比较, $\chi^2 = 3.26 (v = 2), P = 0.1413$, 差异无显著性; 北京组与福建组比较, $\chi^2 = 1.01 (v = 2), P > 0.05$, 差异无显著性; 武汉组与福建组比较, $\chi^2 = 1.85 (v = 2), P = 0.397$, 差异无显著性。

3 讨论

3.1 VDR 基因多态性与骨质疏松关系的研究争议较大, Morrison 等^[5,6]首先发现 VDR 等位基因与骨密度有关, 可能在整个遗传影响中占最大—75%左右, 不久他又报道, 在调整年龄和环境影响后, bb 基因型(文中所指的 VDR I 的 TT 型)人群比 BB 基因型(文中所指的 VDR I 的 GG 型)人群的骨质密度高出

15%。随后 Riggs 等^[7]又提出骨质密度与 VDR 基因的 Apa I、Taq I 的多态性有关。但也有不少研究者提出不同的结果^[8,9]。赵金秀等^[10]研究了 exon7-exon 9 的 Bsm I、Apa I 的酶切位点的多态性与中国人的骨质密度相关性,对年轻女性、年轻男性及绝经期女性 3 组做统计分析没有发现明显差异;而在对具有不同基因型人群的骨密度比较时,发现在年轻女性、绝经期女性中 BB(文中所指的 VDR I 的 GG 型)和 Bb(文中所指的 VDR I 的 GT 型)、AA(文中所指的 VDR II-1 的 GG 型)和 Aa(文中所指的 VDR II-1 的 GT 型)基因型的人群的骨密度差异均有显著性($P < 0.05$);在年轻女性中 AA 与 aa 基因型无差异,而在绝经期女性中则有差异。由此得出 bb 基因型与 aa 基因型有较低的骨密度。

3.2 应用人类基因组学的方法,对北京、武汉、福建 3 个地域的 417 例被诊断为原发性骨质疏松症患者和 60 例正常人,进行了骨质疏松相关基因单核苷酸多态性比较研究。结果如下。

3.2.1 VDR I 基因型研究结果:两组的总体水平比较差异有非常显著性;将对照组与骨质疏松组 GG 基因型与 TT 基因型比较,差异有非常显著性;GG 基因型与 GT 基因型比较,差异有非常显著性。

地区之间总体水平比较,差异有显著性;对照组与北京组比较,差异有显著性;北京组与武汉组比较,差异有显著性。

3.2.2 VDR II-1 基因型两组的总体水平比较,差异有非常显著性;正常人组与骨质疏松患者组 GG 基因型与 TT 基因型比较,差异有非常显著性;GG 基因型与 GT 基因型比较,差异有非常显著性。

3.2.3 本研究结果说明,VDR II-2 基因的 SNP 位点在骨质疏松患者与正常人之间、3 个地区之间差异

无显著性。

本实验研究涉及的 VDR I、VDR II-1、VDR II-2 基因研究中,VDR I、VDR II-1 正常人与原发性骨质疏松症基因的 SNP 位点差异有显著性。地区的差异主要表现在北京与武汉。未发现 VDR II-2、基因的该 SNP 位点与中国人骨质疏松症有关。中国人骨质疏松症患者骨密度与相关基因单核苷酸多态性之间的关系,中医药对相关基因的调控作用,尚待进一步的分析研究。

【参 考 文 献】

- [1] 张清学. 维生素 D 受体基因型与绝经后骨质疏松症的关系. 国外医学妇产科学分册, 1998, 25(5): 6-8.
- [2] Audi L. Genetic determinants of bone mass. Horm Res, 1999, 51: 105-123.
- [3] 贺林. 解码生命. 北京: 科学出版社, 2000. 8-9.
- [4] Nguyen TV. Vitamin D receptors genotypes in osteoporosis. Lancet, 1994, 342: 1580-1581.
- [5] Morrison NA. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. Nature, 1994, 367: 284-287.
- [6] Morrison NA. Contribution of transacting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphisms and circulating osteocalcin. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 6665-6669.
- [7] Riggs BL. The contribution of vitamin D receptor gene alleles to the determination of bone mineral density in normal and osteoporotic women. J Bone Miner Res, 1995, 10: 985.
- [8] Hustmyer FG. Bone mineral density in relation to polymorphism at the vitamin D receptor gene locus. J Clin Invest, 1994, 94: 2130-2134.
- [9] Sung Lim. Lack of association between vitamin D receptor genotypes and osteoporosis in Koreans. Clin Endocrinol, Metab, 1995, 80: 3677-3681.
- [10] Zhao JX. Polymorphisms of vitamin D receptor gene and its association with bone mineral density and osteocalcin in Chinese. Chin Med J, 1997, 110: 366-371.

(收稿日期: 2004-11-18)