

维生素 D 受体基因 Apa I 多态性与核心家庭女性峰值骨密度关系研究

秦跃娟 章振林 黄琪仁 何进卫 陆敬辉 胡云秋 周琦 李淼 刘玉娟

摘要:目的 探讨维生素 D 受体(VDR)基因 Apa I 多态性与中国核心家庭女性峰值骨密度(BMD)的关系。方法 收集上海市 401 个由汉族父母双亲和至少一个健康女儿(年龄在 20~40 岁)组成的核心家庭。运用双能 X 线吸收仪测量女儿腰椎 1~4 和股骨颈、大转子、粗隆间、总髋部及 Ward's 三角的 BMD 值(g/cm^2)。PCR-RFLP 方法分析所有研究对象 VDR 基因 Apa I 多态性。用协方差分析(ANCOVA)和数量性状位点传递非平衡测验法(QTDT)对 Apa I 多态性与 BMD 进行相关、连锁和相关模型下的连锁分析。结果 基因型频率分布符合 Hardy-weinberg 平衡定律。ANCOVA 显示 VDR 基因 Apa I 多态性与女性腰椎峰值 BMD 相关($P=0.047$)。QTDT 分析未发现 VDR 基因 Apa I 多态性与腰椎及股骨近端各部位 BMD 值的相关和连锁。结论 本研究提示 VDR 基因 Apa I 多态性与上海市女性峰值 BMD 值变异无关联和连锁。VDR 基因 Apa I 多态性不是上海市汉族女性峰值 BMD 值变异的数量性状位点。

关键词: 维生素 D 受体基因; 遗传多态性; 骨密度; 维生素 D; 关联分析; 连锁分析

Association of vitamin D receptor gene Apa I polymorphism with peak bone density in Chinese nuclear families QIN Yuejuan ,ZHANG Zhenlin ,HUANG Qiren ,et al. Center for Preventing and Treating Osteoporosis , Osteoporosis Research Unit ,Affiliated Sixth People's Hospital ,Shanghai JiaoTong University ,Shanghai 200233 , China

Abstract: Objective To investigate the relationship between vitamin D receptor(VDR)gene Apa I polymorphism and peak bone mineral density(BMD)variation in Chinese nuclear families. **Methods** A total of 401 nuclear families composed of both parents and at least one healthy daughter aged from 20 to 40 of Han nationality with a total of 1 261 individuals were recruited in the study. All the subjects are native residents in Shanghai city. BMD at the lumber spine and femoral neck ,trochanter ,intertrochanter region ,total hip and ward's triangle were measured by dual-energy X-ray absorptiometry in each subject. Polymorphism for Apa I inside VDR gene was detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP). The analyses of covariance(ANCOVA)and Quantitative trait locus transmission disequilibrium tes(QTDT)approaches were used to simultaneously test the association and linkage between Apa I polymorphism in VDR gene and BMD variation. The raw BMD values were adjusted for age ,height and weight. **Results** Frequencies distribution of alleles followed as Hardy-weinberg equilibrium. The significant association between the spine BMD variation and VDR gene Apa I polymorphism was found using ANCOVA($P=0.047$). Using the program QTDT ,no significant population stratification was found at the spine and proximal femur BMD. For the association test ,no significant effect of the VDR genotypes on spine or hip BMD was detected. When testing for linkage while simultaneously modeling association ,no linkage between spine and hip BMD and polymorphism was found. **Conclusions** Apa I polymorphism in the VDR is not the quantitative trait loc(QTL)underlying peak bone mineral density variation in Shanghai Chinese women.

Key words: Vitamin D receptor gene; Genetic polymorphism; Bone mineral density; Vitamin D; Association study; Linkage study

骨质疏松症是多基因复杂病,其发生与青年时期形成的低峰值骨密度(BMD)及随后骨量丢失速度密切相关,而峰值BMD主要由遗传决定^[1,2]。自1994年,Morrison等^[3]首次报道维生素D受体(vitamin D receptor, VDR)基因多态性与BMD相关以来,骨质疏松候选基因多态性与BMD的关联研究受广泛关注。但不同种族、国家、地区研究结果极不一致,就我国北京、上海和香港等不同地区的研究结果也存在矛盾^[3-10]。差异产生的原因,除了种族、遗传和环境等因素外,还与样本大小、统计方法有关。

为避免人口分层和统计能力不足造成假阳性或假阴性结果,我们采用传递不平衡检测(transmission disequilibrium test, TDT)法,该检测法不受群体分层影响,且析出力高于连锁分析^[11,12]。TDT法在实际应用中成功地锁定了I型糖尿病相关胰岛素基因。因此,我们曾用TDT法完成了雌激素受体- α 基因Xba I和Pvu II多态性与401个上海市核心家庭女性峰值BMD的关系,发现Xba I多态性与股骨近端BMD相关^[13]。在此,我们应用TDT法检测上海市女性峰值BMD与VDR基因Apa I多态性的关系。

1 材料和方法

1.1 对象

从2000年11月至2002年3月在上海市社区张贴广告随机招募了423个由父母双亲和至少一个20~40岁之间的健康女儿组成的核心家庭,其中有22个核心家庭不符合入选标准而剔除(其中6个家庭基因型不符合孟德尔遗传定律,12个家庭父或母亲未提取DNA,4个家庭未完成女儿BMD检测)。入选401个核心家庭,研究对象共1261例,平均家庭成员为3.14个,其中348、49、3和1个家庭分别为1、2、3、4个女儿。每个研究对象均进行健康调查表登记(包括一般情况、月经史、婚育史、烟酒史、疾病史、药物史)、体格检查和有关实验室检查。为最大限度地排除非遗传因素的干扰,入选女儿需身体健康,有规则月经周期,排除存在影响骨代谢的疾病及服用影响骨代谢的药物。

1.2 PCR扩增

每例研究对象取外周静脉血5ml,采用标准酚-氯仿抽提法提取基因组DNA作PCR模板。PCR扩增740bp的VDR基因包含Apa I位点的目的片段,引物合成参照文献^[3](由TaKaRa公司合成):上游:5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAA-3';下游:5'-GCAACTCCTCATGGCTGAGGTCTC-3'。PCR体系:扩增反

应体系为30 μ l,模板DNA 300 ng、三磷酸脱氧核苷(dNTP)至终浓度0.2 mmol/L,引物浓度为0.5 μ mol/L, Taq DNA聚合酶3 U, Buffer 3 μ l,加去离子三蒸水至总体积30 μ l。程序如下:预变性94 $^{\circ}$ C 6 min;变性94 $^{\circ}$ C 30 s;退火57 $^{\circ}$ C 30 s;延伸72 $^{\circ}$ C 45 s,35个循环,72 $^{\circ}$ C保温延伸4 min。

1.3 限制性酶切反应

PCR产物经Apa I内切酶30 $^{\circ}$ C保温酶切6 h后,置1.5%琼脂糖电泳,显示520 bp和220 bp 2条带的为纯合子(aa);显示740 bp 1条带的为纯合子(AA);显示上述3条带的为杂合子(Aa)^[7]。

1.4 BMD测定

应用双能X线吸收仪(DXA Hologic QDR-2000型)测定女儿腰椎1~4(L₁₋₄)和股骨颈(Neck)大转子(Troch)粗隆间(Inter)总髋部(Hip total)和Ward's三角(Ward's)的BMD值(g/cm²)。每天进行质控检查,L₁₋₄、Neck、Troch、Inter、Hip total和Ward's的变异系数(CV)分别为0.97%、1.93%、1.48%、1.31%、0.80%和3.85%。

1.5 统计学处理

通过 χ^2 检验对无亲缘关系的双亲VDR Apa I等位基因频率进行Hardy-Weinberg定律分析。采用群体关联的协方差(ANCOVA, SPSS10.0)分析经年龄、身高和体重调整后的BMD与核心家庭中无亲缘关系的第一个女儿各基因型的关系。用QTDT法(<http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/QTDT/>)对Apa I多态性与腰椎和股骨近端各部位BMD值(经身高、年龄和体重调整后)分别进行相关、连锁,以及相关模型下连锁分析。连锁分析运用生物统计模型的标准方差法。

2 结果

2.1 等位基因和基因型频率

双亲、女儿A,a等位基因频率分别为29%、28%、71%、72%。日本和高加索人群等位频率分别为29%、52%、71%和48%^[14],见表1。我们的等位基因频率与基因型分布与日本人群相似,但A等位基因频率明显少于高加索人群。Apa I等位基因频率符合Hardy-Weinberg定律。

2.2 群体相关分析

应用ANCOVA方法,对401个核心家庭第一个女儿L₁₋₄与股骨近端各部位BMD值与VDR基因Apa I多态性进行相关分析,发现VDR基因Apa I多态性与L₁₋₄BMD值相关($P=0.047$),与股骨近端各

部位 BMD 值均无相关,见表 2。

表 1 中国、日本和高加索人种 Apa I 等位基因和基因型频率分布

调查对象	例数	等位基因频率		基因型频率			H-W 试验 P 值
		A	a	AA	Aa	aa	
本研究双亲	802	0.29	0.71	63	340	398	0.55
本研究女儿	459	0.28	0.72	28	198	233	
日本绝经前妇女*	488	0.29	0.71	42	235	211	
高加索绝经前妇女*	518	0.52	0.48	133	267	118	

注: * 日本和高加索人群资料来自 Tokita 等^[14], H-W 定律验证的 P 值为双亲基因型频率分析结果

表 2 协方差分析(ANOVA)401 例女儿 Apa I 基因型与腰椎和股骨近端 BMD 值的关系($\bar{x} \pm s$)

部位	Apa I			P*
	AA	Aa	aa	
例数	26	167	208	
L ₁₋₄	0.919 ± 0.018	0.966 ± 0.007	0.959 ± 0.006	0.047
Neck	0.752 ± 0.019	0.783 ± 0.008	0.774 ± 0.007	0.276
Troch	0.606 ± 0.016	0.642 ± 0.006	0.635 ± 0.006	0.105
Inter	0.954 ± 0.023	1.005 ± 0.009	0.998 ± 0.008	0.124
Ward's	0.820 ± 0.020	0.860 ± 0.010	0.855 ± 0.010	0.08
Hip total	0.818 ± 0.019	0.861 ± 0.007	0.854 ± 0.007	0.101

注:表中腰椎和股骨近端 BMD 值为年龄、身高和体重校正后;

*表中 P 值为第一个女儿各部位不同基因型 BMD 的 ANCOVA 分析结果

2.3 相关和连锁分析

使用 QTDT 法进行人口分层、相关和连锁,以及相关模型下的连锁分析显示未发现本群体存在人口分层,VDR 基因 Apa I 多态性与 L₁₋₄ 及股骨近端各部位 BMD 值均无相关和连锁,见表 3。

表 3 QTDT 分析腰椎和股骨近端各部位 BMD 值与 Apa I 多态性的人口分层、相关、连锁及相关和连锁关系

部位	分层分析	相关分析	连锁分析	相关模式下连锁分析
L ₁₋₄	0.5320	0.5376	0.6468	0.6468
Neck	0.7913	0.7642	0.1923	0.1976
Troch	0.6985	0.7773	1.0000	1.0000
Inter	1.0000	0.3149	0.1884	0.2418
Ward's	0.8231	0.6101	0.4310	0.4386
Hip total	0.8231	0.5169	0.4463	0.4975

注:表中为 QTDT 分析的 P 值,BMD 经年龄、身高和体重校正后

3 讨论

骨密度随年龄增长在青少年期快速获得,20~40 岁达到峰值。研究表明,遗传与峰值骨密度相

关,腰椎和股骨近端峰值 BMD 的遗传力分别达 0.70 和 0.80^[3]。维生素 D 通过其受体调节肠钙吸收和骨代谢,Morrison 等^[3]首先报道了 VDR 基因 Bsm I 多态性与 BMD 相关,但是中国汉族人群中 Bsm I 多态性 BB 基因型罕见^[5],因此我们选择与 Bsm I 多态性紧密相连的 Apa I 多态性,其位于 VDR 基因 VIII 内含子区,是沉默突变,不改变 VDR 基因编码的氨基酸序列。

尽管 VDR 基因 3'-端多态性(包括 Bsm I、Apa I 和 Taq I)似乎不影响 VDR 基因表达,但至今已有大量关于 VDR 基因 3'-端多态性与不同人种或国家妇女 BMD 的关系研究,并存在矛盾结果。赵金秀等^[9]报道了 96 名北京汉族女性峰值 BMD 与 VDR 基因 Apa I 多态性有关,AA 基因型具有较高的 BMD。Kung 等^[10]的研究发现 VDR 基因 Apa I 多态性与香港地区绝经前妇女腰椎和股骨近端 BMD 值无关。对美国高加索人种和以色列的绝经前妇女研究也有类似报道^[15,16]。我们运用群体关联研究方法分析了 515 例上海市绝经前妇女 BMD 与 VDR 基因 Apa I 多态性的关系,发现该基因多态性与腰椎 BMD 有关,AA 基因型具有较低的 BMD^[8]。一项来自美国 53 个高加索人种家庭的研究发现 VDR 基因 Apa I 多态性与腰椎 BMD 相关和连锁^[17]。以上结果的不一致可能与不同种族人群等位基因的异质性、样本大小、研究设计、人口混杂或分层及其他调节基因的各种影响有关。本研究严格筛选了 401 个上海市汉族核心家庭,首先运用 ANCOVA 分析了 401 个核心家庭中第一个无亲缘关系的女儿(平均年龄 31.21 ± 5.83 岁)VDR 基因 Apa I 多态性与腰椎和股骨近端各部位 BMD 值的关系,显示 Apa I 多态性与腰椎 BMD 显著相关,与股骨近端各部位 BMD 值无相关。

在 BMD 值变异与骨质疏松候选基因多态性的研究中,广泛采用上述群体关联研究,但是关联研究

易受人口分层的影响而产生假阳性或假阴性的结果。即使使用大样本,这种潜在的混杂仍十分明显^[18]。相对于关联研究,传统连锁方法统计能力也有限,因而未能得到广泛应用。因为具备8万个同胞对,也只有80%的可能锁定某一基因与BMD值10%的变异有关,即使某一基因对表型有较大影响(遗传力为40%),依然需要3600~5100个同胞对^[19]。显然,如此大的样本量和昂贵的费用使研究者难以完成。因此,为了减少样本量和人口分层等影响,我们选择了以家庭为背景的QTDT方法,QTDT法比传统的连锁方法具有更强大的能力检测候选基因与BMD值变异的关系。使用401个核心家庭,每个家庭至少有一个女儿,约有90%的能力来解释BMD值10%的变异。尽管本研究ANCOVA显示,腰椎峰值BMD与Apa I多态性有关,但进一步采用QTDT相关分析,未检测到VDR基因Apa I多态性与腰椎BMD值的显著相关性,从而说明QTDT具有避免假阳性的强大功能。而且,也未检测到该多态性与各部位峰值BMD的相关和连锁。

总之,本研究首次将QTDT方法应用于大样本的中国核心家庭,尽管关联研究发现VDR基因Apa I多态性与女性腰椎峰值BMD显著相关,但QTDT方法未检测到Apa I多态性与峰值BMD变异的关联和连锁。因此,VDR基因Apa I多态性不是上海市绝经前女性峰值BMD变异的数量性状位点。

【参 考 文 献】

- [1] Matkovic V, Fontana D, Romina C, et al. Factors that influence peak bone mass formation: a study of calcium balance and the inheritance of bone mass in adolescent females. *Am J Clin Nutr*, 1990, 52: 878-888.
- [2] Rubin LA, Hawker GA, Peltekova VD, et al. Determinants of peak bone mass: clinical and genetic analyses in a young female Canadian cohort. *J Bone Miner Res*, 1999, 14: 633-643.
- [3] Morrison NA, Qi JC, Tokita A, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor gene alleles. *Nature*, 1994, 367: 284-287.
- [4] 章振林, 孟迅吾, 周学瀛, 等. 北京地区汉族妇女维生素D受体基因和降钙素受体基因多态性与骨密度的关系. *中华内分泌代谢杂志*, 2002, 18: 90-94.
- [5] 章振林, 赵金秀, 孟迅吾, 等. 维生素D受体基因起始密码子和3'-端多态性与绝经后妇女骨密度的关系. *中华医学遗传学杂志*, 2003, 20: 5-8.
- [6] Cooper GS, Umbach DM. Are vitamin D receptor polymorphism associated with bone mineral density? A meta-analysis. *J Bone and Miner Res*, 1996, 11: 1841-1849.
- [7] Qin YJ, Zhang ZL, Huang QR, et al. Association of vitamin D receptor and estrogen receptor-alpha gene polymorphism with peak bone mass and bone size in Chinese women. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25: 462-468.
- [8] 何进卫, 黄琪仁, 章振林, 等. 雌激素受体 α 和维生素D受体基因多态性与上海妇女峰值骨量的关系. *中华内分泌代谢杂志*, 2004, 20: 140-142.
- [9] Zhao JX, Zhou XY, Meng XW, et al. Polymorphisms of vitamin D receptor gene and its association with bone mineral density and osteocalcin in Chinese. *Chinese Medical J*, 1997, 110: 366-371.
- [10] Kung AW, Yeung SS, Lau KS. Vitamin D receptor gene polymorphism and peak bone mass in southern Chinese women. *Bone*, 1998, 22: 389-393.
- [11] Xiong MM, Krushkal J, Boerwinkle E. TDT statistics for mapping quantitative trait loci. *Ann Hum Genet*, 1998, 62: 431-452.
- [12] Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*, 1996, 273: 1516-1517.
- [13] Qin YJ, Shen H, Huang QR, et al. Estrogen receptor- α gene polymorphisms and peak bone density in Chinese nuclear families. *J Bone Miner Res*, 2003, 18: 1028-1034.
- [14] 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.
- [15] Alahari KD, Lobaugh B, Econs MJ. Vitamin D receptor alleles do not correlate with bone mineral density in premenopausal Caucasian women from the southeastern United States. *Metabolism*, 1997, 46: 224-226.
- [16] Eckstein M, Vered I, Ish-Shalom S, et al. Vitamin D and calcium-sensing receptor genotypes in men and premenopausal women with low bone mineral density. *Isr Med Assoc J*, 2002, 4: 340-344.
- [17] Deng HW, Shen H, Xu FH, et al. Tests of linkage and/or association of genes for vitamin D receptor, osteocalcin, and parathyroid hormone with bone mineral density. *J Bone Miner Res*, 2002, 17: 686-687.
- [18] Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science*, 1994, 265: 2037-2048.
- [19] Nguyen TV, Blangero J, Eisman JA, et al. Genetic Epidemiological approaches to the search for osteoporosis genes. *J Bone Miner Res*, 2000, 15: 392-401.

(收稿日期:2005-04-08)