

护骨素基因 T149C 多态性对应用糖皮质激素患者骨量的影响

隋满姝 刘素雁 陶天遵 杜玄一 刘晓刚

摘要：目的 探讨应用糖皮质激素患者护骨素(osteoprotegerin, OPG)基因启动子 T149C 单核苷酸多态性与骨密度和骨生化指标的相关性。方法 应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RELP)方法测定 126 例正常健康人(I 组)和 138 例应用大量糖皮质激素的患者(II 组)护骨素基因启动子 T149C 的基因型。应用双能 X 线骨密度仪(DEXA)测定股骨、腰椎等部位的骨密度,同时检测骨代谢生化指标。结果 启动子 T149C 发现 TT、TC、CC 3 种基因型,各基因型分布频率 I 组为 TT 81.75%、TC 16.67%、CC 1.58%, II 组为 TT 82.61%、TC 15.94%、CC 1.45%,两组间无明显差异($P > 0.05$)。II 组各基因型之间股骨颈的骨密度差异有显著意义($P < 0.05$),分别为 TT(0.91 ± 0.06) g/cm², TC + CC (0.87 ± 0.08) g/cm²。经年龄、体重指数等因素校正后,差异仍有明显意义($P < 0.05$)。I 组的各项指标和 II 组的其他指标在不同基因型间的差异均无显著意义(均 $P > 0.05$)。结论 OPG 基因 T149C 基因型在两组间无明显差异,它与肾小球肾炎的发病无关;OPG 基因 T149C 多态性与应用激素患者股骨颈的骨密度明显相关,等位基因 T 可能是骨量的保护因子,它可能与应用糖皮质激素后骨量的丢失有关。

关键词：基因；多态性；单核苷酸；糖皮质激素；骨密度

Effect of T149C polymorphism of osteoprotegerin gene on bone mass in patients with glucocorticoid administration SUI Manshu, LIU Suyan, TAO Tianzun, et al. The Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 1500086, China

Abstract : Objective To investigate the effect of polymorphism (T149C) of promoter region of osteoprotegerin (OPG) gene on bone mineral density (BMD) and markers of bone turnover in patients using glucocorticoid. **Methods**

The T149C genotypes of OPG promoter region were determined by PCR-RFLP in 126 healthy persons (group I) and 138 patients using a large dose of glucocorticoid (group II), and BMD at lumbar spine, femoral neck, trochanter and Ward's triangle etc, were measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA). Markers of bone turnover were also detected. **Results** Hardy-Weinberg equilibrium was evident for OPG polymorphism. The frequency of the genotype was as following: TT 81.75%, TC 16.67% and CC 1.58% in group I; TT 82.61%, TC 15.94% and CC 1.45% in group II. No significant difference was found between the two groups ($P > 0.05$). In group II, the BMD at femoral neck area was (0.91 ± 0.06) g/cm², (0.87 ± 0.08) g/cm² of TT, TC + CC genotypes respectively, among which a significant difference was observed ($P < 0.05$ by ANOVA), and significant difference also presented after adjustment of age and BMI, but not in other markers. In group I, no significant link was observed between OPG polymorphism and BMD with markers of bone turnover. **Conclusions** The genotype of OPG has no relationship with the onset of glomerulonephritis; while the polymorphism (T149C) in OPG gene may have effect on the BMD of femur neck in patients using hormone. Allele T may be the protection factor of bone mass which might be related to the loss of bone mass after medication of glucocorticoid.

Key words: Genes; Polymorphism, single nucleotide; Glucocorticoid; Bone mineral density

作者单位: 150086 哈尔滨, 哈尔滨医科大学附属第二医院肾内科(隋满姝、刘素雁、杜玄一、刘晓刚) 骨科(陶天遵)

通讯作者: 刘素雁, Email: suyuanliu@sina.com

由于糖皮质激素(glucocorticoid, GC)具有抗炎、抗毒素及抑制免疫等作用,而被广泛应用于临床各科。医生对其诸多不良反应虽早已熟知,但对于其诱发骨质疏松症(osteoporosis, OP)的问题却常常忽

略,实际上糖皮质激素性骨质疏松症的发病率仅次于绝经后及老年性骨质疏松症而居第 3 位。骨质疏松是发病率高、死亡率高、保健费用消耗大的骨代谢疾病。引起骨质疏松的病因多种多样,主要有:(1)后天获得骨量不足;(2)遗传基因和基因的多态性,遗传因素决定骨量的 50%~70%^[1]。二者最终表现为破骨细胞功能亢进,骨吸收速率超过骨形成而致骨质疏松。

护骨素(osteoprotegerin,OPG)是肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族成员之一,OPG 基因是调节骨量的一个候选基因。OPG 基因敲除大鼠出现早期骨质疏松、多发性骨折,给大鼠注射重组 OPG 蛋白可使骨量增加^[2,3]。目前多组研究发现 OPG 基因启动子和内含子多态性主要与下列位点有关:T149C、A163G、G209A、T245G、C889T、T950C、G1181C、A6890C。研究发现,163、209、245 和 1181 位点与腰椎骨密度降低或骨折相关^[4]。许多国家对这些部位的基因多态性与绝经后骨质疏松及老年性骨质疏松的骨量和骨代谢指标的相关性进行了研究,结果各不相同。本文首次在国内外对应用糖皮质激素患者 OPG 基因启动子 T149C 单核苷酸多态性及其与骨量、骨代谢指标之间的相关性进行了报导。

1 材料和方法

1.1 对象

表 1 研究对象的一般情况

组别	性别	例数	年龄(岁)	病程(m)	体重(kg)	身高(cm)	BMI(kg/m ²)	GC 累积剂量(mg)
I 组	男	62	33.2±10.4		62.2±6.8	168.6±5.8	23.88±2.75	
	女	64	32.3±11.2		61.4±5.9	160.1±5.3	24.32±2.87	
II 组	男	71	34.2±12.5	6.8±1.7	62.3±5.7	167.4±6.1	22.96±3.31	5136.2±136.4
	女	67	33.8±11.6	6.7±1.9	60.5±6.1	159.2±6.2	23.97±3.25	5132.7±131.8

1.2.2 护骨素基因多态性分析(PCR-RELP 法):OPG 基因序列来自 GeneBank(序列号 AB 008821),引物序列如下^[4]:上游引物 5'-CTGGAGACATATAAC-TTGAACA-3',下游引物 5'-CCATCATCAAACCCCTAT-TGCT-3'(上海生物工程公司合成)。PCR 反应体系包括基因组 DNA 100 ng,PCR 反应条件:95℃预变性 5 min,94℃变性 40 s,55℃退火 40 s,72℃延伸 60 s,最后 72℃延伸 10 min,共 30 个循环。扩增产物为 300 bp,取 3 个样本测序确认,其余经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳确认后,取 PCR 产物加限制性内切酶 Xba I 在 37℃酶解 4 h,在 2.5% 琼脂糖凝胶分离酶解产物,紫外灯下观察基因型。149T→C 在紫外灯下观察结果为纯合子 T/T 电泳图谱为 153 bp 和 147 bp 两条带,纯合子 C/C 为 300 bp 一条带,杂和子 T/C

2004 年 3 月~2005 年 6 月肾内科应用强的松(起始剂量≥1 mg/kg·d)后 6 个月的门诊及住院患者。纳入标准:①凡经临床诊断明确需要应用糖皮质激素(起始剂量≥1mg/kg·d)的慢性肾小球肾炎患者。②年龄男性<50 岁,女性<45 岁,性别不限。③血肌酐、尿素氮正常。④应用激素前 BMD 较正常青年人均值减少<1.0s。排除标准:①除外甲亢、甲旁亢、糖尿病、皮质醇增多症、多发性骨髓瘤等所致的骨质疏松症。②除外类风湿性关节炎、恶性肿瘤、消化道疾病及动脉粥样硬化。③近期使用 VD、钙剂、降钙素、雌激素及激素替代药物等影响骨代谢的药物。④有糖皮质激素禁忌症的患者。⑤应用糖皮质激素有严重负反应的患者。调查和取样均征得受试者本人同意。研究对象分为两组:(1)I 组:正常组,126 例,为门诊健康体检者,BMD 较正常青年人均值减少<1.0s;(2)II 组:应用激素组,138 例,其中肾活检病例 115 例,微小病变型 79 例(57.24%),轻度系膜增生型 28 例(20.29%),中度系膜增生型 23 例(16.67%),膜型 8 例(5.8%)。研究对象的一般情况见表 1,两组在性别、年龄、体重、身高、体重指数(BMI)上无明显差异(P>0.05)。

1.2 方法

1.2.1 外周血基因组 DNA 的提取 抽取外周静脉血 3 mL,EDTA 抗凝,用苯酚-氯仿法提取外周血白细胞基因组 DNA。

为 300 bp、153 bp 和 147 bp 三条带(图 1)。

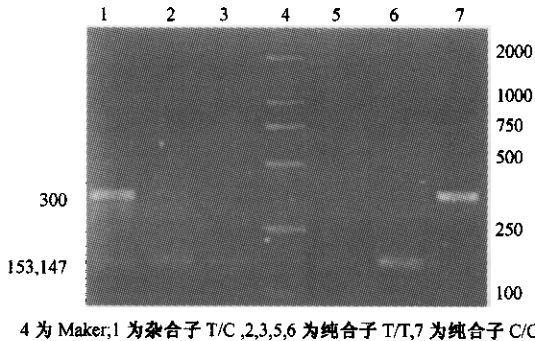


图 1 OPG 基因 T149C 的 PCR 产物酶切电泳图

1.2.3 骨密度测定 采用双能 X 线骨密度测量方法(美国 Lunar 公司 DEXA 检测仪)测量所有正常健康

人和应用激素患者用药前及用药后 6 个月腰椎 2 ~ 4(L₂₋₄)后前位、左股骨颈、大转子、Ward 部位的骨密度,同时检测身高(精确到 mm)、体重(精确到 0.1 kg),计算体重指数(BMI)。

1.2.4 临床及骨生化指标测定 :清晨空腹抽血 5 mL,静置,离心后提取上层清液,查血钙、磷、碱性磷酸酶、血浆白蛋白、尿素氮、肌酐、谷丙转氨酶、谷草转氨酶、甘油三脂、胆固醇及血葡萄糖,生化测定用全自动生化分析仪。留取 24 h 尿,测定 24 h 尿蛋白测定(免疫比浊法,N Larex RF)。骨生化指标检测 :血清骨钙素 放射免疫法(北京北方生物技术研究 所),批内 CV < 10%,批间 CV < 15% ;甲状旁腺激素 化学发光法(美国 DPC 公司)。

1.3 统计学处理

检测值用均数 ± 标准差表示,采用 SPSS12.0 统计学软件。(1) χ^2 检验判断 OPG 基因型是否符合 Hardy-Weinberg 定律,以确定研究样本的群体代表性 ;(2)用协方差校正年龄、身高、体重及体重指数影响后,比较不同基因型之间的骨密度值是否有差异 (ANCOVA)。(3)各基因型间计量资料比较采用单因素方差分析(ANOVA)。

2 结果

2.1 OPG 基因型和等位基因频率的分布

正常对照组 :126 例正常人 中 T149C 基因型 T/T、T/C 和 C/C 的频率分别为 81.75%、16.67% 和 1.58%,等位基因 T 和 C 的频率分别为 91.09% 和 9.91%。

应用激素组 :138 例肾病综合症患者中,T149C 基因型 T/T、T/C 和 C/C 的频率分别为 82.61%、15.94% 和 1.45%,等位基因T和C的频率分别为

90.58%和 9.42%。

将两组合并后分析,T149C 基因型 T/T、T/C 和 C/C 的频率分别为 82.19%、16.28% 和 1.53%,等位基因 T 和 C 的频率分别为 90.33%和 9.67%。

以上两组及合并后基因型频率分布均符合 Hardy-Weinberg 定律,本研究人群是一个平衡群体 (表 2)。

表 2 OPG149T→C 基因型和等位基因频率分布

组别	例数	基因型 Genotype			等位基因 Allele	
		TT(%)	TC(%)	CC(%)	T(%)	C(%)
I 组	126	81.75(103)	16.67(21)	1.58(2)	91.09	9.91
II 组	138	82.61(114)	15.94(22)	1.45(2)	90.58	9.42
合计	264	82.19(217)	16.28(43)	1.53(4)	90.34	9.66

2.2 OPG 基因 T149C 不同基因型和骨密度、骨代谢生化指标之间的关系

T149C 不同基因型之间和骨密度、生化指标的比较见表 3。由于 CC 基因型频率仅占 0.0158、0.0145,故作统计学分析时将 CC 基因型与 TC 基因型合并。正常对照组与应用激素组同种基因型之间各部位骨密度均有明显差异 ($P < 0.05$)。126 例正常对照组 OPG 基因 T149C 的 TT 基因型组腰椎、股骨颈、大转子、Ward 部位的骨密度有高于 TC 和 CC 基因型组的趋势,但差异无显著性 ($P > 0.05$) ;138 例应用激素组 OPG 基因 T149C 的 TT 基因型组股骨颈的骨密度明显高于 TC 和 CC 基因型组 ($P < 0.05$),TT 基因型组在腰椎、大转子、Ward 部位的骨密度有高于 TC 和 CC 基因型组的趋势,但差异无显著性 ($P > 0.05$)。进行协方差分析校正年龄、体重指数对骨密度的影响后,应用激素组的骨密度在股骨颈部位差异仍有明显意义。两组之间及同组各基因型之间生化指标的差异均无显著意义 ($P > 0.05$)。

表 3 T149C 不同基因型与骨密度、生化指标的相关性

基因型	BMD(g/cm ²)				血 ALB (g/L)	血 CHO (mmol/L)	血 TG (mmol/L)	血 AKP (U/L)	血 BGP (g/L)	血 PTH (ng/L)
	L ₂₋₄	FN	TR	WR						
I 组										
TT	1.13 ± 0.12	0.98 ± 0.09	0.81 ± 0.08	0.91 ± 0.09	37.8 ± 5.96	6.04 ± 1.27	3.45 ± 0.86	159.6 ± 12.9	6.12 ± 1.34	39.8 ± 6.04
TC + CC	1.12 ± 0.11	0.94 ± 0.09	0.78 ± 0.07	0.87 ± 0.08	39.4 ± 6.02	5.97 ± 1.13	3.34 ± 0.79	158.7 ± 14.2	6.03 ± 1.25	40.8 ± 6.13
II 组										
TT	1.08 ± 0.17	0.91 ± 0.06 *	0.72 ± 0.11	0.81 ± 0.11	38.3 ± 3.12	6.07 ± 1.32	3.38 ± 0.82	156.9 ± 11.8	6.23 ± 0.52	38.9 ± 3.16
TC + CC	1.02 ± 0.07	0.87 ± 0.08	0.68 ± 0.06	0.77 ± 0.09	39.7 ± 2.96	6.09 ± 1.28	3.42 ± 0.97	152.7 ± 13.8	5.96 ± 0.96	38.6 ± 4.38

注 BMD 骨密度 L₂₋₄ 腰椎 FN 股骨颈 TR 大转子 WR Ward 三角 AKP 碱性磷酸酶 BGP 骨钙素 PTH 甲状旁腺激素 ALB 白蛋白 CHO 胆固醇 TG 甘油三脂与本组基因型 TC + CC 比较,* $P < 0.05$

3 讨论

骨质疏松在世界范围内都是一种严重的健康问题,受到多种因素的影响。遗传因子对骨质疏松的发生发展有重要作用。遗传因素对峰值骨密度的影响达80%,对随后的骨量丢失速率也有很大影响。一些结构基因的突变导致严重的骨失衡,但这可能对于老年人群中大量存在的骨质疏松并不重要。而发现另有一些结构基因和调控基因的精细改变与骨质疏松有联系。国外已有研究^[4-8]证明 OPG 基因多态性与骨质疏松有关,但在不同人群中的研究结论有很大差异。体外研究表明,OPG 具有抑制破骨细胞(OC)形成、分化、存活、活化并诱导 OC 凋亡的功能^[9],其功能与 RANKL 和 RANK 密切相关。OPG 作为分泌性诱饵受体无直接传递信号的能力,它与 RANKL 结合后阻止 RANKL 与 RANK 结合,抑制 OC 的形成和活化,影响其骨吸收功能。糖皮质激素(GC)与其受体(GR)结合,在转录水平调节一些基因表达,如促进成骨细胞(OB)上 RANKL 表达,抑制 OPG 表达,从而引起早期骨吸收增加^[10]。服用糖皮质激素6个月以上的患者,几乎50%都发生骨质疏松性变化^[11],而高剂量糖皮质激素(>10mg/日强的松)则使所有患者都丢失相当大的骨量^[12]。

Langahl 等^[5]对268例老年性骨质疏松患者和327名正常健康人进行 OPG 基因多态性的研究,分析 OPG 起始区及5个外显子后发现12个多态性位点,其中5个多态性位点位于起始区:T149C、A163G、G209A、T245G 和 T950C,同时还发现 T149C、G209A、T245G、C1217T 和 C4441T 是连锁的。本研究首次检测了 OPG 基因 T149C 基因型,并探讨其与骨密度及骨生化指标之间的关系。研究发现,OPG 基因 T149C 基因型频率在正常对照组和应用激素组之间差异无显著性,由于应用激素组患者均为慢性肾小球肾炎患者,说明 OPG 基因 T149C 基因型与慢性肾小球肾炎的发病无关。我们探讨了 OPG 基因 T149C 不同基因型和骨密度、骨代谢生化指标之间的关系,在健康人群中各部位骨密度值基因型 TT 有高于基因型 TC + CC 的趋势,但无统计学意义($P > 0.05$),而在应用激素患者中各基因型之间只有股骨颈的骨密度差异有显著意义($P < 0.05$),各基因型在其他部位的骨密度差异无显著意义,但骨密度表现出 TT > TC + CC 的趋势,即携带 T 等位基因的骨密度较高,提示该基因多态性可能与应用糖皮质激素后骨量的丢失有关,等位基因 T 可能是骨量的保

护因子。Langahl 等^[5]对268例老年性骨质疏松患者和327名正常健康人进行 OPG 基因 T245G 基因型的研究,G 等位基因与老年性骨质疏松骨折的风险有关,但与腰椎及股骨的骨密度无关。Arko 等^[6]对103例自然绝经的高加索妇女(绝经>6年)进行 OPG 基因 T245G 基因型的研究,腰椎部位 TT 基因型骨密度明显高于 TG 基因型($P = 0.005$),与本文报道相似。

总之,本研究通过对126例正常健康人及138例应用糖皮质激素患者 OPG 基因 T149C 基因型与骨密度值的研究,发现 OPG 基因 T149C 基因型在两组间无明显差异,它与肾小球肾炎的发病无关,发现 OPG 基因 T149C 不同基因型骨量丢失程度不同,它可能是糖皮质激素性骨质疏松症骨丢失的影响基因,似可作为糖皮质激素性骨质疏松症发生危险性的遗传标志及早期防治的候选基因之一。进一步探讨 OPG 基因型、骨生化指标水平及体内骨转换状态之间的关系有助于认识糖皮质激素性骨质疏松症的发病机制和基因治疗的作用。

【参考文献】

- [1] Livshits G, Karasik D, Otremski I, et al. Genes play an important role in bone aging. *Am J Hum Biol*, 1998, 10: 421-426.
- [2] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997, 89: 309-319.
- [3] Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*, 1998, 12: 1260-1268.
- [4] Holbatter LC, Schoppert M. Osteoprotegerin gene polymorphism and the risk of osteoporosis and vascular disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87: 4078-4079.
- [5] Langahl BL, Carstens M, Stenkaer L, et al. Polymorphisms in the Osteoprotegerin gene are associated with osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res*, 2002, 17(Suppl 7): 1245-1255.
- [6] Arko B, Prezeli J, Komel R, et al. Sequence variations in the osteoprotegerin gene promoter in patients with postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87: 4080-4084.
- [7] Yoshiji Y, Fujiko A, Naoakira N, et al. Association of polymorphisms of the osteoprotegerin gene with bone mineral density in Japanese women but not men. *Molecular Genetics and metabolism*, 2003, 80: 344-349.
- [8] Wynne F, Drummond F, O'Sullivan K, et al. Investigation of the genetic influence of the OPG, VDR (FokI), and COL1A1 Sps polymorphisms on BMD in the Irish population. *Calcif Tissue Int*, 2002, 71: 26-35.
- [9] Suda T, Takahashi N, Udagawa N, et al. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev*, 1999, 20: 345-357.

(下转第117页)

(上接第 134 页)

- [10] Rubin MR, Bilezikian JP. The role of parathyroid hormone in the pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis :a re-examination of the evidence. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002,87 :4033-4041.
- [11] Adinoff AD, Hollister JR. Steroid-induced fractures and bone loss in patients with asthma. *N Engl Med*, 1983,309 :265-268.

- [12] Garton MJ, Rein DM. Bone mineral density of the hip and of the antero-posterior and lateral dimension of the spine in men with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 1993,36(2) :202-211.

(收稿日期 :2005-06-30)