

细胞色素 P450 c19 基因多态性与老年男性骨质疏松关系的研究

张英男 陶天遵 高萍

摘要:目的 探讨 CYP19 基因多态性与老年男性的性激素水平及骨质疏松的关系。方法 182 例老年男性患者测定腰椎及髋部骨密度 根据骨密度分为骨密度减低(包括骨质疏松及骨量减少)组 94 例和正常组 88 例。所有受试者测 CYP19 基因外显子 3 G→A 的基因多态性 同时测定血清总睾酮(TT)、雌二醇(E_2)、硫酸脱氢表雄酮(DHEAS)、性激素结合球蛋白(SHBG)、血清白蛋白,并计算游离睾酮(FT)、生物有效性睾酮(Bio-T)、游离雄激素指数(FAI)、游离雌二醇(FE_2)、生物有效性雌二醇(Bio- E_2)、TT/ E_2 、FT/ FE_2 及 Bio-T/Bio- E_2 。结果 正常的老年男性与骨密度降低的老年男性比较,CYP19 AA 型基因型频率明显增高,GA 型与 GG 型明显降低($P=0.001$);CYP19 基因 GA 型、GG 型的老年男性,腰椎(L₂₋₄)、股骨颈、Wards 和粗隆的骨密度明显低于 AA 型($P<0.01$, $P<0.05$);CYP19 基因多态性与腰椎(L₂₋₄)、股骨颈、和粗隆的骨密度均密切相关(P 值分别为 0.003、0.001、0.013),但 Wards 的骨密度与 CYP19 基因型无关($P=0.094$);各种性激素与 CYP19 基因型均无相关性($P>0.05$);经逐步 LOGISTIC 回归分析筛选危险因素,BMI 为老年男性骨质疏松的保护性因素($P=0.004$),CYP19G 等位基因及骨折史是老年男性骨质疏松的风险因素($P=0.0285$, $P=0.0031$),对老年男性骨质疏松的影响的大小顺序为,CYP19 基因型,BMI 及骨折史。结论 在汉族老年男性人群中,CYP19 基因的 GA 型与 GG 型可导致腰椎、股骨颈、Wards 及粗隆的骨密度降低。CYP19 G→A 基因多态性与汉族老年男性原发性骨质疏松症密切相关,CYP19 基因可作为研究我国老年男性骨质疏松症病因学的候选基因。

关键词:老年男性;原发性骨质疏松症;性激素;CYP19

Relationship of polymorphisms in P450 c19 with serum concentration of sex hormones and osteoporosis in elderly men ZHANG Yingnan, TAO Tianzun, GAO Ping. Department of General Surgery, 2nd Affiliated Hospital Harbin Medical University, Harbin 150086, China

Abstract: **Objective** To explore the association of the polymorphisms in CYP19 with serum concentration of sex hormones and osteoporosis in elderly men. **Methods** Totally, 182 elderly men were recruited in this study which were divided into healthy ($n=88$) and decreased BMD (osteopenia and osteoporosis, $n=94$) group. Spinal and hip BMD were measured by dual energy X-ray absorptionmetry. The polymorphisms in exon 3 (G→A substitution) of CYP19 and total testosterone (TT), estradiol (E_2), dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) and sex hormone binding globulin (SHBG) were determined by RIA in all subjects. Levels of free T (FT), bioavailable T (Bio-T), free androgen index (FAI), free E_2 (FE_2), bioavailable E_2 (Bio- E_2), TT/ E_2 , FT/ FE_2 and Bio-T/Bio- E_2 were calculated. **Results** CYP19 AA genotypes increased, whereas GA and GG genotypes decreased obviously in the healthy group than the other (70.45%, 20.45%, 9.09% vs 36.00%, 44.00%, 20.00%, $P=0.001$). Those with CYP19 GA and GG genotypes showed lower BMDs at lumbar spine (L₂₋₄), femoral neck, Ward's triangle and trochanter than those of AA (1.08 ± 0.22 , 1.07 ± 0.24 vs 1.25 ± 0.22 ; 0.80 ± 0.14 , 0.82 ± 0.10 vs 0.90 ± 0.13 ; 0.65 ± 0.17 , 0.68 ± 0.14 vs 0.76 ± 0.16 ; 0.76 ± 0.14 , 0.79 ± 0.11 vs 0.86 ± 0.14 ; $P<0.01$ or $P<0.05$). Significant correlation was shown between CYP19 genotype and BMDs at lumbar spine (L₂₋₄), femoral neck, Ward's triangle and trochanter ($P=0.003$, 0.001, 0.013). However, no association was found with BMDs at Ward's triangle. No significant association was seen between CYP19 genotype and the serum levels of sex hormones

作者单位:150086 哈尔滨,哈尔滨医科大学附属第二医院普外科(张英男),骨外科(陶天遵),内分泌科(高萍)

通讯作者:张英男,Email:zyn168861@yahoo.com.cn

($P > 0.05$). CYP19 G allele and history of fracture were the two risk factors and BMI was a protective factor of osteoporosis in elderly men ($P = 0.0285$,0.0031 and 0.004 ,respectively). **Conclusions** In elderly Chinese men ,CYP19 GA and GG genotype can lead to decreased BMDs at lumbar spine ,femoral neck ,Ward's triangle and trochanter . The polymorphisms in exon 3 (G→A substitution) of CYP19 is associated with osteoporosis and CYP19 is a candidate gene for osteoporosis in elderly Chinese men .

Key words : Elderly men ; Osteoporosis ; Sex hormone ; CYP19

目前 ,男性原发性骨质疏松的发病率越来越多 ,但关于老年男性骨质疏松的研究还很少。细胞色素 P450 c19 (cytochrome P450 c19 ,CYP19)基因编码芳香化酶 ,该酶对雄激素向雌激素的转化至关重要 ,局部组织芳香化酶的活性降低 ,可减少该组织雌激素的水平 ,继而引起骨质疏松。最近发现绝经后妇女的雌二醇水平、骨密度与 CYP19 基因外显子 3 的沉默多态性(G→A Val⁸⁰)有关^[1]。笔者拟探讨 ,CYP19 基因多态性是否与老年男性的性激素水平及骨质疏松有关。

1 材料和方法

1.1 研究对象

60 岁以上 (60 ~ 83 岁)的老年男性患者 182 例 ,来自本市 3 个不同社区 ,经问卷及查体 ,除外甲状旁腺、甲状腺及糖尿病等代谢疾病 ,无严重心肝肾功能不全 ,无中风偏瘫 ,无风湿性疾病 ,无长期应用糖皮质激素史 ,未用影响骨代谢的药物。根据骨密度分为骨密度减低 (包括骨质疏松及骨量减少)和正常 2 个组。划分标准 :骨密度低于同部位峰值骨密度 2 个标准差者为骨质疏松症 ,低于 1.0 ~ 2.0 个标准差者为骨量减少 ,低于 1.0 个标准差以内或高于同部位峰值骨密度为正常。骨密度减低组 94 例 ,年龄 : (69.45 ± 6.79)岁 ,正常组 88 例 ,年龄 : (69.61 ± 5.54)岁($P > 0.05$)。

1.2 研究方法

①所有受试者采集静脉血 3 mL ,EDTA 抗凝 ,提取 DNA ,PCR 反应扩增 CYP19 基因 ,CYP19 引物序列 :上游引物 :5'-AGTAACACAGAACAGTTGCA-3' ;下游引物 :5'-TCCAGACTCGCATGAATTCTCCGTA-3' ;25 μL 的反应体系中包括 :200 ng 基因组 DNA ,2.0 mmol/L MgCl₂ ,250 μmol/L dNTP-mix ,0.5 μmol/L primer ,1 U Taq DNA 酶 ,运行 95℃、5 min ,95℃、30 s、56℃、30 s、72℃、30 s ,35 个循环 ;72℃、7 min。酶切分析 CYP19 基因型 ,反应体积为 50 μL ,包括 1 μL CYP19 基因 PCR 产物 (约 20 μg DNA) ,10x 的缓冲液 5 μL ,0.4 μL (5 U)的限制性内切酶 RsaI ,43.5 μL

水。酶切条件为 :37℃ ,消化过夜。酶切产物用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶检测 ,凝胶成像系统分析。根据酶切结果对本标本进行基因分型。

②骨密度检测 :美国 Lunar 公司的 DPX-MD 型骨密度仪测腰椎及股骨的骨密度 ,仪器误差 < 2%。

③性激素及白蛋白的测定 :所有受试者清晨空腹采集静脉血 ,分离血清 , -20℃ 冻存。血清总睾酮 (TT) ,雌二醇 (E₂) ,硫酸脱氢表雄酮 (DHEAS) ,性激素结合球蛋白 (SHBG)应用放射免疫法测定。试剂盒由 Orion 公司提供。TT、E₂、DHEAS、SHBG 批内及批间差异分别为 3.8% ,4.8% ,7.3% ,5.1% ,3.5% ,4.0% ,4.0% ,5.5%。仪器采用 GC-2010 型 γ 计数器 (中佳光电公司) 。血清白蛋白应用免疫比浊法测定。游离睾酮 (FT) ,生物有效性睾酮 (Bio-T) ,游离雄激素指数 (FAI) ,游离雌二醇 (FE₂) ,生物有效性雌二醇 (Bio-E₂) ,通过计算得出^[2]。

1.3 统计学处理

测定数据以用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$)表示 ,用 SPSS 12.0 版统计软件进行数据分析。

2 结果

2.1 CYP19 基因型及等位基因频率的分布

骨密度正常的老年男性与骨密度降低的老年男性比较 ,CYP19 基因 AA 型基因型频率明显增高 ,GA 型与 GG 型明显降低 ($\chi^2 = 15.25$, $P = 0.001$)。正常组的 A 等位基因频率明显增高 ,G 等位基因频率明显减低 ($\chi^2 = 18.14$, $P = 0.001$) ,见表 1。

表 1 CYP19 基因型频率及等位基因频率

组 别	例数	基因型频率*			等位基因频率**	
		AA (%)	GA (%)	GG (%)	A (%)	G (%)
正常组	88	6 (70.5)	19 (20.5)	8 (9.1)	14 (80.7)	3 (19.3)
骨量减少组	94	2 (36.0)	47 (44.0)	25 (20.0)	9 (52.1)	9 (47.9)

注 : * $\chi^2 = 18.14$, $P = 0.001$; ** $\chi^2 = 15.25$, $P = 0.001$

2.2 CYP19 基因多态性与骨密度的关系

CYP19 基因为 GA 型、GG 型的老年男性 ,腰椎 (L₂₋₄) ,股骨颈、Wards 和粗隆的骨密度明显低于 AA

型($P < 0.01$, $P < 0.05$) ,GG 型与 GA 型的老年男性比较 ,各部位骨密度值无显著变化($P > 0.05$,表 2)。经多元线性回归的方法分析 ,CYP19 基因型与腰椎(L_{2-4})、股骨颈、和粗隆的骨密度均密切相关(P 值分别为 0.003 , < 0.001 , 0.013) ,但 Wards 的骨密度与 CYP19 基因型无关($P = 0.094$)。上述结果说明 CYP19 基因的 GA 型、GG 型与低骨密度密切相关(表 3)。

表 2 CYP19 不同基因型骨密度的变化			
部位	AA	GA	GG
N	86	66	30
L_{2-4}	1.25 ± 0.22	$1.08 \pm 0.22^*$	$1.07 \pm 0.24^*$
股骨颈	0.90 ± 0.13	$0.80 \pm 0.14^*$	$0.82 \pm 0.10^*$
Wards	0.76 ± 0.16	$0.65 \pm 0.17^*$	$0.68 \pm 0.14^{**}$
粗隆	0.86 ± 0.14	$0.76 \pm 0.14^*$	$0.79 \pm 0.11^{**}$

注 : * $P < 0.01$ (vs AA) ; ** $P < 0.05$ (vs AA)

表 3 CYP19 基因多态性与骨密度的相关性分析			
部位	标准偏回归系数 Beta	t	P
L_{2-4}	0.315	2.979	0.003
股骨颈	0.684	3.931	< 0.001
Wards	0.294	- 1.684	0.094
粗隆	0.390	2.505	0.013

注 : 校正 $R^2 = 0.193$

2.3 CYP19 基因多态性与性激素的关系

经多元线性回归分析 ,除 DHEAS 与 SHBG 外($P < 0.03$, $P < 0.027$) ,TT、FT、Bio-T、FAI、 E_2 、 FE_2 、Bio- E_2 及各种 T 与相应 E_2 的比值与 CYP19 基因型

均无相关性($P > 0.05$,见表 4)。

表 4 CYP19 基因型与血清性激素水平的相关性分析			
项 目	标准偏回归系数 Beta	t	P
DHEAS	- 0.162	- 2.182	0.03
SHBG	- 0.166	- 2.235	0.027
TT	0.012	0.154	0.878
FT	0.049	0.579	0.563
Bio-T	0.059	0.698	0.486
FAI	0.049	0.518	0.605
E_2	- 0.072	- 0.973	0.332
FE_2	- 0.062	- 0.826	0.410
Bio - E_2	- 0.069	- 0.908	0.365
TT/ E_2	- 0.016	0.212	0.832
FT/ FE_2	- 0.017	0.233	0.816
Bio-T/Bio- E_2	- 0.017	0.233	0.816

注 : 校正 $R^2 = 0.034$

2.4 老年男性骨质疏松的影响因素

经 LOGISTIC 全因素回归分析 ,老年男性骨质疏松与 BMI、每日摄钙量、骨折史及 CYP19 的基因型有关 ,与年龄、吸烟量、饮酒量及每日运动时间无关(检验水准 $\alpha = 0.15$)。经逐步 LOGISTIC 回归分析筛选危险因素 ,BMI 为老年男性骨质疏松的保护性因素($P = 0.004$) ,CYP19G 等位基因及骨折史是老年男性骨质疏松的风险因素($P = 0.0285$, $P = 0.0031$) ,对老年男性骨质疏松的影响的大小顺序为 ,CYP19 基因型、BMI 及骨折史(表 5)。

表 5 逐步 LOGISTIC 回归分析结果								
变量	回归系数 β	标准误	Wald χ^2	P	标准回归系数 β	OR	OR 的 95% CI	
							下限	上限
BMI	- 1.3805	0.4802	8.2640	0.0040	- 0.370234	0.251	0.098	0.645
骨折史	1.2045	0.5499	4.7978	0.0285	0.265999	3.335	1.135	9.799
CYP19	1.8214	0.6149	8.7732	0.0031	0.374645	6.180	1.852	20.627

3 讨论

雌激素对骨重建及维持骨量有重要的意义。控制雌激素合成的基因—CYP19 对于研究原发性骨质疏松症是非常重要的候选基因。多数研究表明 CYP19 基因多态性与男性骨质疏松有关 ,但相关的报道均为 CYP19 基因(TTTA)_n 串联重复多态性^[3-5]。只在最近发现绝经后妇女的雌二醇水平 ,骨密度与 CYP19 基因外显子 3 的沉默多态性(G→A Val⁸⁰)有

关^[1]。目前 ,在老年男性人群中还未见 CYP19 基因外显子 3 的沉默多态性(G→A Val⁸⁰)与骨质疏松症及性激素关系的报道。

本研究发现骨密度正常与骨密度降低的老年男性比较 ,CYP19 基因 AA 型基因型频率明显增高 ,GA 型与 GG 型明显降低 ,A 等位基因频率明显增高 ,GA 型、GG 型的老年男性 ,腰椎、股骨颈、Wards 和粗隆的骨密度明显低于 AA 型 ;多元线性回归分析也显示 CYP19 基因多态性与腰椎、股骨颈、和粗

隆的骨密度密切相关 ;LOGISTIC 回归分析结果显示 ,CYP19G 等位基因是老年男性骨质疏松的风险因素 ,与其他影响因素 BMI 及骨折史相比 ,CYP19 基因型对老年男性骨质疏松的影响最显著。上述结果提示 ,在汉族老年男性中 ,CYP19 基因的 GA 型与 GG 型可导致骨密度降低及骨质疏松。

曾有学者证实 ,老年男性中 (TTTA)_n 串联重复多态性与 17 β -雌二醇的水平及骨密度有关^[5]。John 也证明 ,绝经后妇女的雌二醇水平与 CYP19 基因外显子 3 的沉默多态性(G $\rightarrow$ A Val⁸⁰)证明有关^[1]。本研究结果与他们相反 ,发现 CYP19 基因多态性与血清 TT、FT、Bio-T、E₂、FE₂ 及 Bio-E₂ 水平无相关性。本研究检测的是 CYP19 基因外显子 3 的沉默多态性(G $\rightarrow$ A Val⁸⁰) ,可能会出现与(TTTA)_n 串联重复多态性不同的结果。其次 ,John 的研究对象为女性 ,而本研究为男性 ,性别不同所引起的性激素的差异是不容忽视的问题。此外 ,人种的因素也不能排除。最后 ,CYP19 基因多态性对性激素及骨密度影响的分子机制尚不清楚 ,曾有报道 ,TTTA 等位基因可能是通过与 CYP19 或邻近基因有功能的变异形成连锁失衡而影响芳香化酶的活性^[6,7]。CYP19 基因外显子 3 的沉默多态性(G $\rightarrow$ A Val⁸⁰)是通过何种途径影响芳香化酶的目前还无从推测。总之 ,该领域的研究目前还太少 ,CYP19 基因 G $\rightarrow$ A 多态性对男性性激素影响尚需更多更深入的研究。

综上所述 ,在汉族老年男性人群中 ,CYP19 基因的 GA 型与 GG 型可导致腰椎、股骨颈、Wards 及粗隆的骨密度降低。CYP19 G $\rightarrow$ A 基因多态性与汉族

老年男性原发性骨质疏松症密切相关 ,CYP19 基因可作为研究我国老年男性骨质疏松症病因学的候选基因。

【 参 考 文 献 】

- [1] Benz DJ , Haussler MR , Thomas MA , et al. High-affinity androgen binding and androgenic regulation of $\alpha 1$ (I)-procollagen and transforming growth factor- β steady state messenger ribonucleic acid levels in human osteoblast-like osteosarcoma cells. *Endocrinology* , 1991 ,128 :2723-2730.
- [2] Sodergard R , Backstrom T , Shanbhag V , et al. Calculation of free and bound fractions of testosterone and estradiol-17 β to human plasma proteins at body temperature. *J Steroid Biochem* , 1982 , 16 :801-810.
- [3] Zhuang YH , Blauer M , Pekki A , et al. Subcellular location of androgen receptor in rat prostate , seminal vesicle and human osteosarcoma MG-63 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* ,1992 ,41 : 693-696.
- [4] Takeuchi M , Kakushi H , Tohkin M. Androgens directly stimulate mineralization and increase androgen receptors in human osteoblast-like osteosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* ,1994 ,204 : 905-911.
- [5] Orwoll ES , Stribrka L , Ramsey EE , et al. Androgen receptors in osteoblast-like cell lines. *Calcif Tissue Int* ,1991 ,49 :183-187.
- [6] Liesegang P , Romalo G , Sudmann M , et al. Human osteoblast-like cells contain specific , saturable , high-affinity glucocorticoid , androgen , estrogen , and 1 α 25-dihydroxy-cholecalciferol receptors. *J Androl* ,1994 ,15 :194-199.
- [7] Etienne MC , Fischel JL , Milano G , et al. Steroid receptors in human osteoblast-like cells. *Eur J Cancer* ,1990 ,26 :807-810.

(收稿日期 :2005-12-25)