

安徽地区绝经后妇女低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 基因多态性与骨密度的关系

朱翔 章秋 王佑民 王长江 杨洋 郭延云

摘要: **目的** 研究安徽地区绝经后妇女低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 基因(LRP 5)Q 89 R 和 A 1330 V 多态性位点与骨密度的关系。**方法** 采用 PCR-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法检测安徽地区 247 名绝经后妇女 LRP 5 基因 Q 89 R 和 A 1330 V 多态性位点的基因型,双能 X 线骨密度仪测定腰椎和股骨的骨密度。**结果** 本研究人群中,LRP 5 基因 Q 89 R 和 A 1330 V 多态性呈连锁不平衡($\chi^2 = 24.48, P < 0.01$)。Q 89 R 位点 QR 组的股骨颈、Ward's 三角和大转子区骨密度明显低于 QQ 组,A 1330 V 位点 AV/VV 组的股骨颈骨密度明显低于 AA 组。在调整年龄、身高、体重、BMI 以及绝经年限这些影响因素后,Q 89 R 多态位点与股骨颈和大转子区骨密度显著相关($P < 0.05$),而 A 1330 V 多态性位点则与各位点的骨密度均无相关性。**结论** LRP 5 基因 Q 89 R 多态性位点可能对绝经后妇女骨密度有影响,提示 LRP 5 基因是影响骨密度的候选基因之一。

关键词: LRP 5; 骨密度; 基因多态性; 绝经后

Association between LDL receptor-related protein 5 gene polymorphisms and bone mineral density in Anhui postmenopausal women ZHU Xiang, ZHANG Qiu, WANG Youmin, et al. Department of Endocrinology in the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China

Abstract: **Objective** To investigate the association of Q 89 R and A 1330 V polymorphisms in low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP 5) gene with bone mineral density (BMD) in Anhui postmenopausal women. **Methods** Q 89 R and A 1330 V genotypes were analyzed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) in 247 postmenopausal women in Anhui. BMD at lumbar spine 2-4 and the left proximal femur were measured by dual-energy X-ray absorptiometry in all subjects. **Results** Q 89 R and A 1330 V polymorphisms were in linkage disequilibrium in the subjects($\chi^2 = 24.48, P < 0.01$). BMD at the femoral neck, ward's and trochanter was significantly lower in subjects with Q 89 R QR genotype than in the combined group with QQ genotype. BMD at the femoral neck was significantly lower in subjects with A 1330 V AV/VV genotype than those with AA genotype. Q 89 R polymorphism was significantly associated with BMD at the femoral neck and trochanter($P < 0.05$) after adjusting for age, height, weight, BMI and years since menopause. No significant association was found between A 1330 V polymorphism and BMD at any site after adjusting these impact factors. **Conclusion** Q 89 R polymorphism in LRP 5 gene may have an influence on BMD in postmenopausal women, which suggests that LRP 5 gene is a candidate for the genetic determination of BMD.

Key words: LRP 5; Bone mineral density; Gene polymorphism; Postmenopausal

低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 基因(LRP 5)属于低密度脂蛋白受体家族,是成骨细胞增殖和骨形成中一个重要的调节因子。LRP 5 基因的异常可导致骨密度的异常降低或升高,近来被确认为是影响骨密度的基因之一。因此,本研究以安徽地区绝经

后妇女为对象,探讨 LRP 5 基因 Q 89 R 和 A 1330 V 这两个位点的多态性与骨密度的关系,以明确其是否可以作为预测妇女骨质疏松危险性的遗传标志。

1 材料和方法

1.1 研究对象

选择长期居住在安徽地区的健康自然绝经后妇女 247 例,年龄(61.80 ± 6.68)岁,身高(156.76 ± 5.25) cm,体重(59.77 ± 8.36) kg,绝经年限($12.20 \pm$

基金项目:安徽省自然科学基金资助项目(2006KJ370B)

作者单位:230022 合肥,安徽医科大学第一附属医院内分泌科

通讯作者:章秋,Email:aynfmk@163.com

7.08)年。研究对象入选时均经过详细病史询问,排除患影响骨密度的疾病(原发性骨质疏松症除外),未服用过影响骨代谢的药物者(如雌激素、降钙素、二磷酸盐、糖皮质激素、维生素 D 等)。

1.2 研究方法

1.2.1 外周血基因组 DNA 的提取:抽取受试者外周静脉血 2 mL,EDTA 抗凝,用全血 DNA 提取试剂盒(QIAGEN 公司)提取基因组 DNA。

1.2.2 基因型检测:(1)LRP 5 基因 Q 89 R 多态性分析:0.2 μ g DNA 模板在 50 μ L 反应体系内进行 PCR 扩增(引物 F: 5'-TCTGGGCATAGTGCTCCATC-3',R:5'-TTCCGGGATGTGCCATTGAG-3')。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,56 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 反应产物经纯化后,用限制性内切酶 Ava II 37 $^{\circ}$ C 消化过夜,消化的 PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色。QQ 基因型个体显示 436 bp 片断,RR 基因型个体显示 274 bp 和 162 bp 2 个片断,QR 基因型个体显示 436 bp,274 bp 和 162 bp 3 个片断。(2)LRP 5 基因 A 1330 V 多态性分析:0.2 μ gDNA 模板在 50 μ L 反应体系内进行 PCR 扩增(引物 F: 5'-GACTGTCAGGACCGCTCACACG-3', R: 5'-AAGGTTTTTCAGAGCCCCTAC-3')。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,61 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 反应产物用限制性内切酶 Dra III 37 $^{\circ}$ C 消化过夜,消化的 PCR 产物用 15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳。AA 基因型个体显示 143 bp 片断,VV 基因型个体显示 119 bp 和 24 bp 2 个片断,AV 基因型个体显示 143 bp,119 bp 和 24 bp 3 个片断。(3)骨密度测定:采用双能 X 线骨密度仪(法国 DMS 公司,CHALLENGER 型)测量所有研究对象腰椎 2~4(L₂₋₄)、股骨近端股骨颈(Neck)、Ward's 三角区、大转子区(Troch)骨密度值。仪器每日使用前用标准体模测量 1 次,连续 5 日,5 次测量结果的 CV(变异系数)<1%。(4)统计学处理:采用 SPSS 10.0 for window 统计软件,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示。Hardy-Weinberg 平衡吻合度分析采用 χ^2 检验。组间比较采用成组 *t* 检验(方差齐者直接选择 *t* 检验,不齐者选用 *t'* 检验),并对相关指标进行多元回归分析(逐步回归法),以 *P*<0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 基因型频率

LRP 5 基因 Q 89 R 和 A 1330 V 位点的基因型分布和等位基因频率见表 1。经遗传平衡检验,该两位点基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡(Q 89 R: $\chi^2 = 2.023, P = 0.155$; A 1330 V: $\chi^2 = 0.105, P = 0.746$)。两种多态性呈连锁不平衡($\chi^2 = 24.48, P < 0.01$,见表 2)。

表 1 Q 89 R 和 A 1330 V 位点的基因型分布和等位基因频率

基因位点	基因型			等位基因频率	
	QQ	QR	RR	Q	R
Q 89 R	206(83.4%)	41(16.6%)	0	0.917	0.083
A 1330 V	AA	AV	VV	A	V
	175(70.9%)	65(26.3%)	7(2.8%)	0.84	0.16

表 2 Q 89 R 和 A 1330 V 多态性位点间的关系

组别	AA	AV	VV
QQ	159	43	4
QR	16	22	3

2.2 Q 89 R 和 A 1330 V 位点的基因型分布与骨密度的关系

由于位点 VV 型的研究对象数很少(*n* = 7),故将 AV 型与 VV 型合并后与 AA 型分析。QQ 组相对 QR 组以及 AA 组相对 AV/VV 组在年龄、身高、体重、BMI 以及绝经年限上差异无显著性,但 QR 组股骨颈、Ward's 三角区和大转子区骨密度明显低于 QQ 组,A 1330 V 位点的 AV/VV 组的股骨颈骨密度明显低于 AA 组(表 3)。进一步调整年龄、身高、体重、BMI 和绝经年限后进行多元回归分析(逐步回归法),结果显示 Q 89 R 多态性与股骨颈和大转子区骨密度显著相关,与腰椎以及 Ward's 三角区骨密度无关;而在排除了以上影响因素的作用后发现 A 1330 V 多态性位点与各位点的骨密度均无相关性(表 4)。

表 3 LRP 5 基因 Q 89 R 和 A 1330 V 位点不同基因型的临床资料比较

观察指标	Q 89 R		A 1330 V	
	QQ(<i>n</i> = 206)	QR(<i>n</i> = 41)	AA(<i>n</i> = 175)	AV/VV(<i>n</i> = 72)
年龄(岁)	60.9 $\pm$ 6.7	62.1 $\pm$ 6.5	61.5 $\pm$ 6.3	60.0 $\pm$ 7.5
身高(cm)	157.0 $\pm$ 5.4	156.3 $\pm$ 4.4	156.6 $\pm$ 5.3	157.7 $\pm$ 5.0
体重(kg)	60.1 $\pm$ 8.7	59.5 $\pm$ 7.2	60.2 $\pm$ 8.5	59.4 $\pm$ 8.4
BMI(kg/m ²)	24.9 $\pm$ 3.0	25.4 $\pm$ 4.0	25.2 $\pm$ 3.2	24.7 $\pm$ 3.1
绝经年限(年)	11.6 $\pm$ 7.1	11.5 $\pm$ 6.7	12.0 $\pm$ 6.9	10.5 $\pm$ 7.2
L ₂₋₄	0.793 $\pm$ 0.091	0.784 $\pm$ 0.103	0.784 $\pm$ 0.080	0.791 $\pm$ 0.127
Neck	0.747 $\pm$ 0.087	0.692 $\pm$ 0.081 *	0.750 $\pm$ 0.081	0.741 $\pm$ 0.122 *
Ward's	0.468 $\pm$ 0.162	0.422 $\pm$ 0.129 *	0.439 $\pm$ 0.089	0.501 $\pm$ 0.153
Troch	0.613 $\pm$ 0.089	0.560 $\pm$ 0.078 *	0.611 $\pm$ 0.092	0.612 $\pm$ 0.102

注:同组内不同基因型之间相比较,* *P*<0.05,* *P*<0.01

表 4 LRP 5 基因 Q 89 R 和 A 1330 V 位点与不同部位骨密度的回归分析

项目	Q 89 R		A 1330 V	
	β	P	β	P
L2-4	-0.064	0.073	0.026	0.672
Neck	-0.06	0	-0.057	0.355
Ward's	-0.097	0.092	0.355	0.111
Torch	-0.052	0.001	-0.005	0.931

注:调整因素为年龄、身高、体重、绝经年限和 BMI

3 讨论

本研究人群 LRP 5 基因多态位点基因频率同高加索人相比存在差异^[1]:Q 89 R 位点的多态性在高加索人中非常罕见(Q 频率为 100%),A 1330 V 位点(A 频率为 91%),与日本^[2,3]、韩国^[4]、上海^[5]以及香港^[6]的基因频率分布相似。提示该等位基因频率分布可能存在种族差异,在亚洲蒙古人种中保持一致。

我们研究发现,Q 89 R 多态性位点 QR 型妇女的股骨颈、Ward's 三角区和大转子区骨密度明显低于 QQ 型,和已有研究^[4-6]报道结果基本一致。同时发现,安徽地区绝经后妇女 LRP 5 基因在调整年龄、身高、体重、BMI 以及绝经年限这些影响因素后与股骨颈和大转子区骨密度显著相关($P < 0.05$),提示 Q 89 R 多态性位点可能与骨峰值的获得有关。Zhang 等^[5]以及 Lau 等^[6]的研究中,同样也发现了 Q 89 R 多态性位点与女性股骨颈骨密度的相关性。本研究未发现 Q 89 R 多态性位点与腰椎骨密度的相关性,与 Koh 等^[4]以及 Zhang 等^[5]研究一致;且未发现 Q 89 R 多态性位点与 Ward's 三角区骨密度的相关性,而在 Koh 等^[4]对 219 个韩国年轻男性的研究指出 Q 89 R 多态性位点与 Ward's 三角区骨密度是显著相关的($P < 0.05$),这种研究结果的差异考虑系研究对象的不同所引起。但考虑到本研究对象例数较少,Q 89 R 位点在本研究人群中的突变率较低,且 Ward's 三角区骨密度值的精确度、误差和变异系数百分比是骨密度检查各位点中最大的^[7],不能排除这些因素导致上述差异的可能性。Ferrari 等^[8]通过对 889 个健康高加索人研究发现 A 1330 V 多态性位点与骨密度之间没有相关性,Koh 等^[4]的研究也得出相同结论,这与我们的研究中所发现的在排除了以上影响因素的作用后 A 1330 V 多态性位点与各位点的骨密度均无相关性的研究结果也是一致的。

LRP 5 基因位于染色体 11q12-13 上,有 23 个外显子,由 1615 个氨基酸组成的单跨膜蛋白,分为胞外区、跨膜区、胞内区。胞外区含有 3 个基本结构

域:6 个由 YWTD 序列形成的 β -螺旋结构,每一个 β -螺旋结构后是表皮生长因子结构域,最后面的是 3 个低密度脂蛋白受体结构域即 LDL 结合位点。Q 89 R 和 A 1330 V 多态性位点分别位于编码第 1 个螺旋结构的 2 号外显子和编码 LDL 受体结构域的 18 号外显子。Little 等^[9]的研究提示第 1 个螺旋结构内的点突变可以改变局部的疏水环境从而可能影响了 LRP 5 和其他蛋白质之间的相互作用。因此推测 Q 89 R 多态性位点可能通过改变 LRP 5 蛋白质功能从而影响了骨密度。

总之,通过对 247 例安徽地区绝经后妇女 LRP 5 基因 Q 89 R 和 A 1330 V 多态性位点与骨密度的关系的研究,我们发现 Q 89 R 多态性位点与骨密度相关,但没有发现 A 1330 V 多态性位点与骨密度的相关性,提示 LRP 5 基因是影响骨密度的候选基因之一。但由于 LRP 5 基因 Q 89 R 位点在本研究人群中的突变率较低,因此该结果尚待进一步扩大样本量以证实。

【参 考 文 献】

[1] Van Wesenbeeck L, Cleiren E, Gram J, et al. Six novel missense mutations in the LDL receptor-related protein 5 (LRP 5) gene in different conditions with an increased bone density. *Am J Hum Genet*, 2003,72(3):763-771.

[2] Okubo M, Horinishi A, Kim DH, et al. Seven novel sequence variants in the human low density lipoprotein receptor related protein 5 (LRP 5) gene. *Hum Mutat*, 2002,19(2):186.

[3] Suwazono Y, Kobayashi E, Uetani M, et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 variant Q 89 R is associated with hypertension in Japanese females. *Blood Press*, 2006,15(2):80-87.

[4] Koh JM, Jung MH, Hong JS, et al. Association between bone mineral density and LDL receptor-related protein 5 gene polymorphisms in young Korean men. *J Korean Med Sci*, 2004,19(3):407-412.

[5] Zhang ZL, Qin YJ, He JW, et al. Association of polymorphisms in low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene with bone mineral density in postmenopausal Chinese women. *Acta Pharmacol Sin*, 2005,26(9):1111-1116.

[6] Lau HH, Ng MY, Cheung WM, et al. Assessment of linkage and association of 13 genetic loci with bone mineral density. *J Bone Miner Metab*, 2006,24(3):226-234.

[7] ZHU XY, ZHU HM, ZHANG XM. Study of bone mineral density in Ward's region. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2005,11(4):460-463 (in Chinese).

[8] Ferrari SL, Deutsch S, Choudhury U, et al. Polymorphisms in the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP 5) gene are associated with variation in vertebral bone mass, vertebral bone size, and stature in whites. *Am J Hum Genet*, 2004,74(5):866-875.

[9] Little RD, Carulli JP, Del Mastro RG, et al. A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet*, 2002,70(1):11-19.

(收稿日期:2006-10-08)