

维生素 D 受体基因 Apa I 多态性与骨质疏松症相关性的研究

陈占文 陈晓亮 王德春 程永耿 张海光 周政刚

摘要: **目的** 研究维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)基因 Apa I 多态性与原发性骨质疏松症的相关性。**方法** 应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析技术测定山东半岛地区 155 例骨质疏松患者和 113 例对照者维生素 D 受体基因 Apa I 多态性,比较两组基因型和等位基因分布频率。**结果** 两组基因型和等位基因差异有显著性($P < 0.05$)。男性及 < 65 岁骨质疏松组同相应对照组相比差异无显著性,女性及 ≥ 65 岁骨质疏松组同相应对照组相比差异有显著性($P < 0.05$); ≥ 65 岁女性骨质疏松组 aa 基因型与 a 等位基因频率高于其对照组。**结论** 山东半岛地区汉族人群中,维生素 D 受体基因 Apa I 多态性与原发性骨质疏松症存在相关性,65 岁及以上女性 a 等位基因是易感基因,aa 基因型个体存在易感性。

关键词: 维生素 D 受体; 基因型; 遗传多态性; 骨质疏松症

The study of the association between Apa I polymorphism of vitamin D receptor gene and osteoporosis

CHEN Zhanwen, CHEN Xiaoliang, WANG Dechun, et al. Department of Spinal surgery, Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, China

Abstract: **Objective** To detect the association between Apa I polymorphism of vitamin D receptor(VDR) gene and primary osteoporosis. **Methods** The Apa I polymorphism of VDR gene was tested by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) in 155 patients with osteoporosis and 113 healthy beings in Shandong peninsula. The distributing frequency of genotypes and alleles was compared between the two groups as well as the gender and age groups. **Results** There was statistical significance between the two groups genotypes and allelic genes($P < 0.05$). There was no statistical significance of genotype and allele between male case group and male control group, but statistical significance of genotype and allele was found in female group ($P < 0.05$). Statistical significance of genotype and allele was not found between the case group(< 65 years old) and the control group(< 65 years old), but statistical significance was found in the group(≥ 65 years old). The distributing frequency of "aa" genotype and "a" allele in female group (≥ 65 years old) was higher than that of the control group. **Conclusions** Among the Han people in the Shandong peninsula, there was association between the Apa I polymorphism of VDR gene and osteoporosis, "a" allele of female (≥ 65 years old) was susceptible gene, and the people with "aa" genotype were susceptible to osteoporosis.

Key words: Vitamin D receptor; Genotype; Genetic polymorphism; Osteoporosis

骨质疏松症是一种受多基因调控的骨代谢性疾病,维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)基因是其中研究最多也是最有争议的候选基因之一。目前的研究大多集中在健康人群 VDR 基因多态性与骨密度(bone mineral density, BMD)的关系上,但对于骨质疏松的基因研究最好采用骨质疏松作为直接研究

表型,以确保能找到与骨质疏松风险性直接相关的重要基因^[1]。另外,VDR 基因多态性与骨质疏松以及骨密度的关系受到研究对象的种族和生活环境等多种因素的影响,我国地域大,人口多,有 50 多个民族,生活环境及生活习惯有很大差异。本研究以骨质疏松作为研究表型,应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性技术首次对中国山东半岛地区汉族人群 VDR 基因 Apa I 多态性同原发性骨质疏松症的相关性进行了研究。

作者单位: 266003 青岛,青岛大学医学院附属医院脊柱外科

通讯作者: 陈晓亮, Email: chenxlqd@yahoo.com.cn

1 材料和方法

1.1 对象

研究对象来自 2004 年 1 月至 2005 年 12 月青岛大学医学院骨科门诊、住院患者,均为长期居住在山东半岛地区的无亲缘关系的汉族人,排除患有各种影响骨代谢疾病(骨质疏松及骨质疏松性骨折除外)者,排除近 3 个月服用过影响骨代谢药物者。骨质疏松组 155 例,其中男性 73 例,女性 82 例,按国际骨质疏松症的诊断标准(BMD 值小于正常年轻成人 BMD 平均值 2.5 个标准差)确定入选标准。对照组 113 例,其中男性 52 例,女性 61 例。两组年龄范围均为 50~80 岁。

1.2 方法

1.2.1 测定骨密度:所有研究对象均用双能 X 线骨密度仪测定腰椎 1-4(L₁₋₄)后前位及左股骨股骨颈、Wards 三角、大转子的骨密度和骨矿含量。

1.2.2 基因组 DNA 提取:抽取静脉血 2 mL,EDTA 抗凝,选用小量血液基因组 DNA 抽提试剂盒提取 DNA, -20℃ 保存备用。

1.2.3 PCR 扩增及产物鉴定:引物序列参考文献^[2],由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,正向引物 5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAA-3';反向引物 5'-GCAACTCCTCATGGCTGAGGTCTC-3'。反应体系:DNA 模板 300 ng, dNTP 浓度 0.2 mmol/L, 引物浓度 0.3 mmol/L, TaqDNA 聚合酶 3 U, MgCl₂ 溶液浓度 1 mmol/L, 10×PCR 缓冲液 5 μL, 加相应体积的无菌超纯水至总体积 50 μL。反应条件:先 94℃ 预变性 3 min, 然后 94℃ 变性、66℃ 退火、72℃ 延伸各 1 min, 共 40 个循环, 循环结束后再延伸 10 min。

1.2.4 限制性片段长度多态性分析:Apa I 酶切反应体系:PCR 产物 0.1 μg, Apa I 内切酶 5 U, 10×缓冲液 1.5 μL, 加无菌超纯水至 15 μL。37℃ 下消化 3 h, 终止后用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 然后用紫外线凝胶图像分析系统分析基因型。存在 Apa I 酶切位点的纯合子 aa 显示 520 bp 和 220 bp 2 条带, 没有 Apa I 酶切位点的纯合子 AA 显示 740 bp 1 条带, 杂合子 Aa 则显示 740 bp、520 bp、220 bp 3 条带。

1.2.5 统计学处理:用基因计数法分别统计骨质疏松组和对照组基因型和等位基因频率, 数据经 Hardy-Weinberg 平衡检验后, 用 SPSS 11.5 统计软件分析。两组之间的基因型和等位基因频率差异用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 PCR 产物鉴定及 Apa I 酶切结果

PCR 产物片段长度 740 bp, 通过限制性内切酶 Apa I 对其消化发现 VDR 基因存在多态性(图 1)。

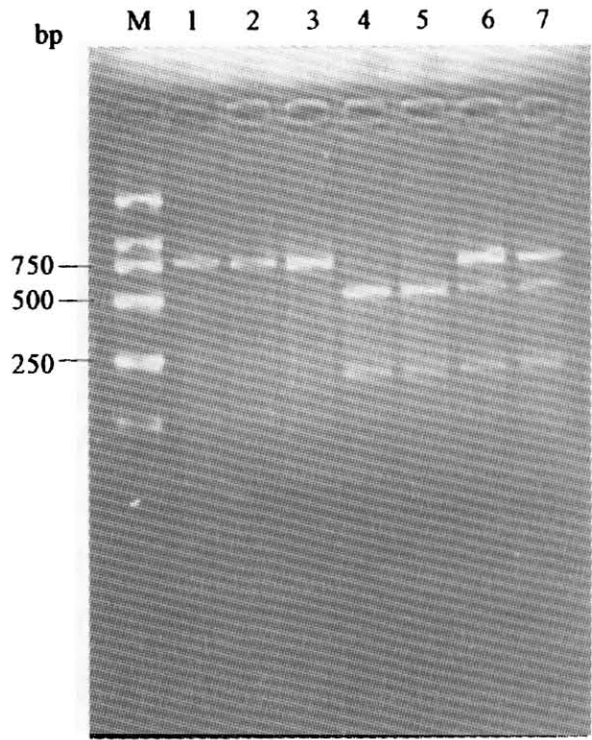


图 1 VDR 基因 Apa I 多态性分析

2.2 Hardy-Weinberg 平衡检验

先统计骨质疏松组和对照组各基因型例数, 算出基因型频率, 再用基因计数法分别计算出骨质疏松组和对照组各等位基因例数及频率。Hardy-Weinberg 平衡检验结果显示两组的等位基因分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡, 说明资料代表性好。

2.3 骨质疏松组与对照组 VDR 基因型和等位基因分布频率比较(表 1)

骨质疏松组和对照组 aa、AA、Aa 基因型分布频率差异有显著性($\chi^2 = 8.673, P < 0.05$)。用卡方分割法检验, AA、Aa 两种基因型分布频率差异无显著性($\chi^2 = 0.972, P > 0.05$), 将 AA 和 Aa 两组合并, aa 和合并组基因型频率差异有极显著性($\chi^2 = 7.681, P < 0.01$), 骨质疏松组 aa 基因型频率高于对照组。骨质疏松组和对照组 a 和 A 等位基因分布频率差异有极显著性($\chi^2 = 9.734, P < 0.01$), 骨质疏松组 a 等位基因分布频率高于对照组。

2.4 不同性别骨质疏松组与对照组 VDR 基因型和等位基因分布频率比较(表 1)

男性骨质疏松组与男性对照组基因型和等位基因的分布频率差异无显著性($P > 0.05$)。女性骨质疏松组与女性对照组 aa、AA、Aa 基因型分布频率差异有显著性($\chi^2 = 8.438, P < 0.05$)。用卡方分割法检验, aa 和 AA、Aa 合并组基因型频率的差异有极显

著性($\chi^2 = 8.323, P < 0.01$),骨质疏松组 aa 基因型分布频率高于对照组。女性病例组与对照组 a、A 等位基因分布频率差异有极显著性($\chi^2 = 9.336, P < 0.01$)。

表 1 骨质疏松组与对照组男、女性基因型和等位基因频率比较

组别	基因型(%)			等位基因(%)	
	aa	AA	Aa	a	A
骨质疏松组	108(69.7)	7(4.5)	40(25.8)	256(82.6)	54(17.4)
男性	46(63.0)	3(4.1)	24(32.9)	116(79.5)	30(20.5)
女性	62(75.6)	4(4.9)	16(19.5)	140(85.4)	24(14.6)
对照组	60(53.1)	12(10.6)	41(36.3)	161(71.2)	65(28.8)
男性	28(53.9)	5(9.6)	19(36.5)	75(72.1)	29(27.9)
女性	32(52.4)	7(11.5)	22(36.1)	86(70.5)	36(29.5)

2.5 不同年龄骨质疏松组与对照组 VDR 基因型和等位基因分布频率比较(表 2、3)

< 65 岁、≥ 65 岁骨质疏松组和对照组性别构成差异无显著性($P > 0.05$)。< 65 岁骨质疏松组和 < 65 岁对照组基因型和等位基因分布频率差异无显著性($P > 0.05$)。≥ 65 岁骨质疏松组和对照组 aa、AA、Aa 基因型分布频率差异有显著性($\chi^2 = 6.609, P < 0.05$)。用卡方分割法检验,aa 和 AA、Aa 合并组基因型频率差异有显著性($\chi^2 = 5.504, P < 0.05$),骨质疏松组 aa 基因型分布频率高于对照组。≥ 65 岁骨质疏松组和对照组 a、A 等位基因分布频率差异有极显著性($\chi^2 = 7.384, P < 0.01$)。

表 2 不同年龄骨质疏松组和对照组性别构成情况比较

组别	性别(%)	
	男性	女性
骨质疏松组	73(47.1)	82(52.9)
< 65	28(44.4)	35(55.6)
≥ 65	45(48.9)	47(51.1)
对照组	52(46.0)	61(54.0)
< 65	19(40.4)	28(59.6)
≥ 65	33(50.0)	33(50.0)

表 3 不同年龄骨质疏松组和对照组基因型和等位基因构成情况比较

组别	基因型(%)			等位基因(%)	
	aa	AA	Aa	a	A
骨质疏松组	108(69.7)	7(4.5)	40(25.8)	256(82.6)	54(17.4)
< 65	45(71.4)	3(4.8)	15(23.8)	105(79.5)	21(20.5)
≥ 65	63(68.5)	4(4.3)	25(27.2)	151(85.4)	33(14.6)
对照组	60(53.1)	12(10.6)	41(36.3)	161(71.2)	65(28.8)
< 65	27(57.4)	4(8.5)	16(34.1)	70(74.5)	24(25.5)
≥ 65	33(50.0)	8(12.1)	25(37.9)	91(68.9)	41(31.1)

3 讨论

骨质疏松症是发生于全身骨骼系统的一种复杂的多基因遗传疾病。VDR 基因位于 12 号染色体

(12q13.1),长度超过 100kb^[3],由 9 个外显子和 8 个内含子组成。Apa I 酶切位点位于 VDR 基因第 8 个内含子,酶切位点为 GGGCCC,没有酶切位点时序列为 GTGCCC。VDR 基因 Apa I 多态性并不影响 VDR 的氨基酸序列,其多态性影响 VDR 功能可能是通过影响 mRNA 的稳定性和蛋白质的翻译效率而实现的。

有关 VDR 基因 Apa I 多态性与原发性骨质疏松症相关性的研究,我国黄琪仁等^[4]对上海地区 228 例 60 岁以上和 160 例 60 岁及以下男性 VDR 基因 Apa I 多态性同骨密度的相关性研究显示,所有 388 例和 160 例 60 岁及以下者 Apa I 基因型与腰椎和股骨近端各部位 BMD 值均无相关性;228 例 60 岁以上者 Apa I 基因型与腰椎、股骨颈、Ward's 三角 BMD 值均相关,AA 基因型平均 BMD 值高于 aa 和 Aa 基因型,但是 Apa I 基因型与股骨大转子部位 BMD 值无相关性,提示 Apa I 多态性可能影响老年男性的松质骨和皮质骨骨量的丢失。我国香港 Lau 等^[5]对 237 例 70 ~ 79 岁男性研究发现 Apa I 多态性与腰椎和股骨近端各部位 BMD 值均无相关性。对于女性的研究,我国赵金秀等^[6]研究表明中国汉族绝经后妇女 aa 型者腰椎骨密度显著低于 Aa 型,但 Lau 等^[5,7]的研究却未发现 Apa I 基因型同骨密度的关系。病例对照研究方面,我国北京、武汉、福建三地共 477 例单核苷酸多态性病例对照研究显示骨质疏松组 Apa I 基因型分布与对照组之间差异有显著性,且骨质疏松组地区间差异也有显著性,骨质疏松组 aa 型所占比例显著高于对照组^[8]。在国外,澳大利亚一项对 39 例 20 ~ 40 岁黑人男性和 44 例年龄、身高、体重配比的白人男性进行研究,发现两种族 Apa I 基因型均与腰椎骨密度显著相关,aa 型腰椎骨密度比 AA 型低 6.7%^[9]。Sainz 等^[10]对美国的墨西哥裔 100 例健康青春期前女孩的研究表明,aa 型者比 AA 型者股骨颈骨密度高 2% ~ 3%,腰椎骨密度高 8% ~ 10%,差异均有显著性。朝鲜^[11]和西班牙^[12]的研究都表明绝经后妇女 VDR 基因 Apa I 多态性与 BMD 相关联,但芬兰^[13]研究却提示绝经后妇女 VDR 基因 Apa I 多态性对 BMD 没有影响。病例对照研究方面,Ensrud 等^[14]对美国明尼苏达州 9704 例 65 岁以上女性的前瞻性病例对照研究表明,经年龄、种族、骨密度等因素调整,髌部、椎体或其他部位骨折病例与相应对照组之间的 Apa I 基因型分布差异均无显著性。

本研究在对所有 268 例被研究者及 143 例女性

组的研究显示 VDR 受体 Apa I 多态性同骨质疏松有关联,骨质疏松组 aa 基因型及 a 等位基因频率高于对照组,而对 125 例男性组的研究未显示 Apa I 多态性同骨质疏松有关联。将骨质疏松组和对照组按年龄分组进行比较,≥65 岁组 VDR 受体 Apa I 多态性同骨质疏松有关联,骨质疏松组 aa 基因型与 a 等位基因频率高于同年龄对照组,<65 岁组 VDR 受体 Apa I 多态性同骨质疏松无关联。本研究结果表明山东半岛地区汉族人群 VDR 基因 Apa I 酶切位点多态性与原发性骨质疏松症存在相关性,65 岁以上女性 a 等位基因是骨质疏松症的易感基因,aa 基因型个体存在对骨质疏松症的易感性。

有关 VDR 基因 Apa I 位点多态性与原发性骨质疏松症的相关性各地学者的研究结果不一致的原因可能与种族差异、生活环境、研究方法、样本量等多种因素有关。今后的研究最好在更多地区、民族,更大样本量的基础上采取统一的纳入标准和研究设计方法进行研究。

【 参 考 文 献 】

- [1] 邓红文,Recker RR.骨质疏松症的遗传学研究及其基因定位的方法和现状.中国骨肿瘤骨病杂志,2002,1(5):277-282.
- [2] Fountas L, Moutsatsou P, Kastanias I, et al. The contribution vitamin D receptor gene polymorphisms in osteoporosis and familial osteoporosis. Osteoporos Int, 1999,10:392-398.
- [3] Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, et al. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. Gene, 2004,338(2): 143-156.
- [4] 黄琪仁,章振林,秦跃娟,等.维生素 D 受体基因 Apa I 多态性与男性骨量的关系.中国医学科学院学报,2003,25(3):254-257.
- [5] Lau EMC, Young RP, Ho SCH, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density in elderly Chinese men and women in Hong Kong. Osteoporos Int, 1999,10:226-230.
- [6] Zhao J, Zhou X, Meng X, et al. Polymorphism of vitamin D receptor gene and its association with bone mineral density and osteocalcin in Chinese. Chin Med J, 1997,110(5): 366-371.
- [7] Lau EM, Lam V, Li M, et al. Vitamin D receptor start codon polymorphism (FokI) and bone mineral density in Chinese men and women. Osteoporos Int, 2002,13:218-221.
- [8] 谢雁鸣,胡松年,韩华,等.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.中国骨质疏松杂志,2005,11(1):54-57.
- [9] Bell NH, Morrison NA, Nguyen TV, et al. Apa I polymorphisms of the vitamin D receptor predict bone density of the lumbar spine and not racial difference in bone density in young men. J Lab Clin Med, 2001,137(2): 133-140.
- [10] Sainz J, Tornout JMV, Loro ML, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and bone density in prepubertal American girls of Mexican descent. N Eng J Med, 1997,337(2): 77-82.
- [11] Choi YM, Jun JK, Choe J, et al. Association of the vitamin D receptor start codon polymorphism (Fok I) with bone mineral density in postmenopausal Korean women. J Hum Genet, 2000,45:280-283.
- [12] Gomez C, Naves ML, Barrios Y, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms, bone mass, bone loss and prevalence of vertebral fracture: differences in postmenopausal women and men. Osteoporos Int, 1999,10:175-182.
- [13] Valimaki S, Tahtela R, Kainulainen K, et al. Relation of collagen type I alpha 1 (COL1A1) and vitamin D receptor genotypes to bone mass, turnover, and fractures in early postmenopausal women and to hip fractures in elderly people. Eur J Intern Med, 2001,12:48-56.
- [14] Ensrud KE, Stone K, Cauley JA, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and the risk of fractures in older women. J Bone Miner Res, 1999,14(10): 1637-1645.