

成都地区骨质疏松症患者骨密度与 I 型胶原 α_1 链基因 Sp1 结合位点多态性的相关性研究

李勇 沈彬 牟健雄 王燎 裴福兴

中图分类号: R31 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)05-0308-05

摘要:目的 探讨 I 型胶原 α_1 链(COL1A1)基因 Sp1 结合位点的多态性与成都地区骨质疏松症患者骨密度的相互关系。方法 (1)选取四川大学华西医院门诊骨质疏松症患者中合格的自愿受试者 237 例,应用双能 X 线吸收法测定其第 2~4 腰椎(L₂~L₄)部位的骨密度值;(2)抽取受试者外周静脉血 2 ml,提取白细胞基因组 DNA;(3)采用聚合酶链反应(PCR)扩增目的基因所在的 DNA 片段(第 1112~1328 核苷酸之间的片段,扩增产物长度为 217 bp);(4)应用聚合酶链反应—限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法检测外周血白细胞基因组 COL1A1 基因 Sp1 结合位点多态性,扩增产物经限制性内切酶 Van91I(pflMI)酶切,琼脂糖凝胶电泳观察,有酶切位点用 S 基因表示,无酶切位点用 s 基因表示。结果 237 例受试对象中,所有标本的扩增片段都能被限制性酶识别并切开,未能观察到 I 型胶原 α_1 链 Sp1 结合位点 G→T 突变, COL1A1 基因型均为野生纯合子 SS 型,未发现 Ss 基因型和 ss 基因型。结论 在成都地区部分汉族骨质疏松症患者中,未发现 COL1A1 基因 Sp1 结合位点的多态性,其腰椎骨密度可能与 I 型胶原 α_1 链基因 Sp1 结合位点多态性无关。

关键词:骨质疏松; COL1A1 基因; 多态性; 骨密度

Relationship between the polymorphism of Sp1 site of collagen I alpha 1 gene and bone mineral density (BMD) in osteoporotic patients in Chengdu region LI Yong, SHEN Bin, MU Jianxiang, et al. Department of Orthopedics, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, China

Abstract: **Objective** To investigate the relationships between COL1A1 gene polymorphisms and bone mineral density(BMD) in voluntary osteoporotic patients in Chengdu region. **Methods** (1) 237 voluntary osteoporotic outpatients in West China Hospital of Sichuan University were selected and their BMD were measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) at lumbar spine (L₂-L₄). (2) 2 ml peripheral blood was drawn-off and genomic DNA was extracted from white blood cells. (3) The specific fragment which includes the objective gene was amplified by Polymerase chain reaction (PCR); (4) the genotypes of SP1 binding site in COL1A1 were detected by Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method. The PCR product was digested with restriction endonuclease Van91I(pflMI) and the result was observed by agarose gel electrophoresis. The capital letter S represents for the presence of the restriction endonuclease site, while the small letter s for the absence of the restriction endonuclease site. **Results** All the PCR products were recognized and cut-off by the restriction endonuclease Van91I(pflMI). The 237 samples showed normal wild type homozygotes SS of COL1A1 gene, neither type Ss nor type ss was found. **Conclusions** In these voluntary osteoporotic patients in Chengdu, COL1A1 gene polymorphism at Sp1 binding cannot be found. There is no certain correlation between lumbar vertebrae BMD and Sp1 binding site COL1A1 gene polymorphism.

Key words: Osteoporosis; COL1A1 gene; Polymorphism; Bone mineral density (BMD)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30600622)

作者单位: 610041 成都,四川大学华西医院骨科

通讯作者: 沈彬, Email: shenbin71@hotmail.com

随着我国人口老龄化加快,骨质疏松症及其引发的骨折的发生率日益增高。根据我国‘九五’攻关课题对五大行政区(华北、华东、中南、西南、东北)48615 例(其中 7182 例用双能 X 线吸收测定仪测量腰椎及股骨骨密度)的流行病学研究结果表明:目前我国已是世界上拥有骨质疏松症患者最多的国家,40 岁以上人群中,骨质疏松症与低骨量的患病率女性分别为 19.9% 和 32.4%, 男性分别为 11.5% 和 45.8%^[1]。

骨质疏松症被认为受遗传和环境及其他因素共同作用,但遗传因素是其中的主要因素。其中 I 型胶原基因被广泛认为与骨质疏松症及骨密度的关系较为密切^[2-6]。有报道指出 COL1A1 基因中的转录因子 Sp1 结合位点的单核苷酸多态性(SNPs)与骨密度的关系密切,但也有研究者得出不同的结果^[7-9]。为了解成都地区汉族人骨质疏松患者腰椎骨密度与 I 型胶原的关系,笔者采用聚合酶链反应-限制性酶切片段长度多态性(PCR-RFLP)技术,抽样检测成都地区汉族人群 COL1A1 基因 Sp1 结合位点多态性,并进行腰椎骨密度测定,以期探讨该基因与成都地区人群骨质疏松患者腰椎骨密度之间的关系。

1 对象与方法

1.1 实验仪器和试剂

仪器 法国 DMS 公司 Challenger 双能 X 线吸收骨密度测量仪(DEXA);iTC2000 实时荧光定量基因扩增仪,加拿大枫岭(FUNGLYN)公司;MSE Micro-Centaur Centrifuge 微型台式离心机,日本 Sanyo 公司;微量移液器,法国 Gilson 公司;水平电泳仪,美国 BIO-RAD 公司;Gel Doc 1000 凝胶成像系统,美国 BIO-RAD 公司。

试剂:DNA 抽提试剂盒,上海生物工程有限公司;Taq DNA 聚合酶、PCR 反应缓冲液(10×)、MgCl₂ 溶液(25 mmol/L),北京博大泰克(BioDev)生物基因技术有限责任公司;dNTP,美国普洛麦格(Promega)公司;限制性内切酶 Van91I (pflMI) (10 U/μl),Fermentas 公司;琼脂糖(电泳级),法国 BIOWEST 公司产品,上海 Yito 企业有限公司分装)。

1.2 对象

纳入标准:①2007 年 3 月~2007 年 6 月华西医院就诊的成都地区汉族人群,临床诊断骨质疏松症且自愿受试者;②腰椎骨密度测量 T 评分小于 -2.5 倍标准差(T < -2.5);③在成都地区居住 10 年以

上。

排除标准:①不愿参与该项研究的患者;②患有(或曾患有)与骨代谢相关疾病,如严重肝、肾脏疾病(骨质疏松症及骨折除外)者;③正服用可能影响骨代谢药物如将降钙素、二膦酸盐、维生素 D 及雌激素者。

最终 237 例入选,女性 212 例,男性 25 例。受试者年龄:女性 42~77 岁,平均(60.50±7.18)岁,男性 49~74 岁,平均(59.00±9.19)岁。

1.3 方法

1.3.1 骨密度测定:使用法国 DMS 公司 Challenger 双能 X 线吸收骨密度测量仪(DEXA)测定患者腰椎前后位骨密度。每次开机后均用模体校正,测量误差小于 0.5%,常年 < 1%。测定时,患者平卧于扫描台中央,屈髋屈膝,将小腿搁于一方形塑料块上,促使腰椎生理弧度变直。

1.3.2 COL1A1 基因 Sp1 多态性分析

1.3.2.1 提取基因组 DNA:抽取外周血 2 ml, EDTA 抗凝,从外周血分离白细胞后抽提 DNA, DNA 的浓度测定及纯度判定,取 DNA 溶液用 TE 液做适量稀释,以 TE 液作空白对照,在紫外分光光度计上读取 A₂₆₀ 和 A₂₈₀ 的吸光度(A)值。

按下面公式计算浓度:DNA 浓度(μg/μl) = A₂₆₀ 值 × 50 × 稀释倍数/1000, DNA 纯度的判定:A₂₆₀/A₂₈₀ 比值应介于 1.7~2.0 之间。

1.3.2.2 PCR 扩增目的片段:方法:PCR 扩增 COL1A1 基因第一内含子 Sp1 结合位点多态性部分,上游引物:5'-GATGCTCTAGCTGCTGGAGGTT-3',下游引物:5'-AGGCTCGTGGGGAGTGGCTT-3'(四川大学华西分子遗传学实验室设计并合成)。PCR 反应条件为 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 60 s, 63℃ 退火 60 s, 72℃ 延长 45 s 共 35 个循环, 72℃ 再延长 5 min。琼脂糖电泳确认产物为 217 bp 的目的片段。

1.3.2.3 COL1A1 基因 Sp1 位点多态性分析

首先将目的片段进行纯化,然后用限制性内切酶 Van91I(pflMI)于 37℃ 酶切消化过夜(酶切位点:5'-CCANNNN↓NTGG-3'),再进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,电压 110 V,电泳 40 min,最后以 0.2 mg/L 溴乙锭染色 30 min, Gel Doc 1000 凝胶成像系统观察结果,并摄影。如无 Sp1 位点 G→T 突变则电泳可见分别位于约 130 及 87 bp 附近的两条带。否则只能看见一条约 217 bp 的产物条带,即存在 Sp1 位点 G→T 的点突变。有酶切位点的用大写字母(S)表示,无酶切位点的用小写字母(s)表示。

表 1 不同性别受试者骨密度测量结果

指标	女性	男性	t 值	P 值
年龄(岁)	60.50 ± 7.18	59.00 ± 9.19	0.438	≥0.05
体重指数(BMI)	24.61 ± 2.78	23.45 ± 3.14	0.895	≥0.05
腰椎骨密度(L ₂ ~L ₄)	0.56 ± 0.06	0.58 ± 0.03	-0.742	≤0.05
T 评分	-2.96 ± 0.37	-2.91 ± 0.29	-0.304	≥0.05

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用 SPSS 11.5 软件包,采用 *t* 检验进行检验,检验假设为男女两组数据的样本均数是否有差别,检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 受试者腰椎骨密度测量结果(表 1)

2.2 COL1A1 基因型分布

本次实验扩增的是前 I 型胶原 α_1 基因(pro-COL1A1, 全长 17537 bp) 第 1112~1328 核苷酸之间的片段,扩增产物为 217 bp,当第一内含子的第 1245 位点为鸟嘌呤(G)时,加入 Van91I(pflMI)内切酶时,PCR 扩增产物就被酶切成 130 及 87 bp 两个片段。Van91I(pflMI)酶切识别位点为 CCANNNN↓NTGG),如果该位置的 G→T 时, Van91I(pflMI)酶切位点就消失。把存在酶切位点基因定为 S,不存在酶切位点则为 s。本次测试的所有样本 DNA 经 PCR 扩增, Van91I(pflMI)酶切、琼脂糖电泳后,均可看到 130 及 87 bp 大小的两条带(图 1),说明本次受试的 237 例人群中 COL1A1 基因型均为 SS 型而无 Ss、ss 基因型,即本次所测试的人群中,不存在 Sp1 位点 G→T 的点突变。

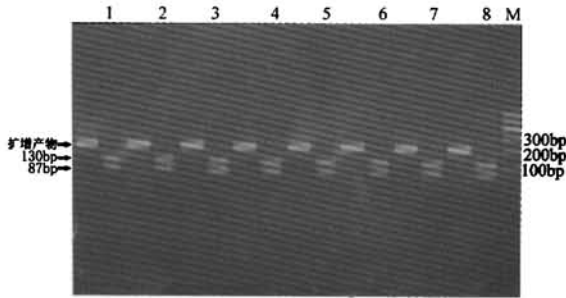


图 1 琼脂糖凝胶电泳图

琼脂糖凝胶电泳后,标记 1~8 孔道均可看到 130 及 87 bp 大小的两条带,为完全切开;每一标记孔道前边出现的 217 bp 条带是用作对照的未酶切的扩增产物

3 讨论

I 型胶原是组成骨构架和形成骨力学强度最基

本的基质蛋白质,占骨基质蛋白质的 90% 以上,并与其他蛋白质结合,形成胶原网基质结构,为羟基磷灰石的沉积提供沉着点。I 型胶原蛋白三螺旋结构由两条 α_1 链和一条 α_2 链组成,极少部分由 3 条 α_1 链形成。编码 I 型胶原的 α_1 链基因位于 17q21.3~q22,大小约为 18 kb, I 型胶原基因突变导致的共同特点是 I 型胶原的力学功能障碍,骨脆性增加及骨的成熟和发育障碍。目前对于 COL1A1 多态性与骨密度关系研究中,主要集中在绝经后妇女人群中,不少学者发现该基因 Sp1 结合位点的多态性与骨密度值密切相关^[2-6]。

1996 年英国的 Grant 等^[2]报道 COL1A1 基因第 1 内含子上与转录因子 Sp1 结合的位点上有一个 G→T 突变所产生的多态性,可能与骨质疏松有关,他们发现这 299 名绝经后妇女的脊椎骨密度在 SS(G/G 纯合子),Ss(G/T 杂合子),ss(T/T 纯合子)基因型依次减低,而且 Ss 和 ss 基因型的妇女发生骨质疏松骨折的比例更高。1998 年,在荷兰有 1778 例绝经后骨质疏松妇女参加的遗传流行病学调查再次肯定了这一结论^[6]。COL1A1 等位基因与骨密度相关的细胞及分子生物学原理还不清楚, Mann 等^[10]提出,具有“s”基因的个体,改变了其 COL1A1 和 COL1A2 之间的产量比例,从而推测骨峰值的下降可能是改变了骨的几何结构和骨小梁的厚度,当面临增龄或更年期到来时,他们就具有更高的骨折风险。但是,来自其他一些国家的研究则认为 COL1A1 基因的多态性并不能反映绝经后妇女的骨矿含量或骨丢失速度。瑞士、荷兰、瑞典、芬兰、比利时、赞比亚等国家虽然发现有 Sp1 位点多态性,但并没发现其与骨质疏松相关^[11,12]。除 2004 年陶军等^[13]在《中国骨质疏松杂志》上发表的一篇研究中报道在江西省 60 例门诊原发性骨质疏松症患者中,用扩增抗突变系统-聚合酶链反应(ARMS-PCR)的方法检出一例 Ss 外,在韩国的 Han 等^[7]和国内的类似研究中均未能检出 Ss 或 ss 个体^[14,15],这也与我们的检测结果类似。

本实验检测的骨密度结果显示:237 例受试者

分为男女两组,其在年龄构成、体重指数、以及 T 评分方面作均数的 t 检验(检验水准取 $\alpha = 0.05$),两者的差异没有统计学意义,而骨密度的差异有统计学意义,且男性组较女性组略高。造成这种差异可能是由于男女两种性别在骨密度的 T 评分中的标准不一样所致。相同条件下,相同的骨密度值男性的 T 评分较女性略低。在这次实验中,笔者查阅了很多国内外相关的检测资料,并尽可能采取一些措施减少假阴性的可能。尽管本次检测的 237 份标本全是骨质疏松患者的标本,但仍未能检出一例 Sp1 位点 G $\rightarrow$ T 的突变。简要分析如下。首先,本次实验每个标本提取的 DNA 都是经过浓度和纯度检测的,都是合格的,其次,这次实验扩增的片段长度为 217 bp,酶切片段长度分别为 130 和 87 bp,长度相差 43 bp,酶切片段经电泳后条带清晰可见。最后,本次实验选择 Van91I(pflMI)酶切识别位点为 CCANNN $\downarrow$ NTGG;如果该位置的 G $\rightarrow$ T 时, Van91I(pflMI)酶切位点就消失,所以酶切开的都是 S 基因,不能切开的为 s 基因。而此前的国内的实验多采用切开为突变的 s 基因,不能切开的 S 基因,而且实验结果往往是未能切开,未能切开的干扰因素众多,若不能全部排除,实验结果容易受到影响。而本次实验结果均全部切开,结果更为可靠。本次实验不足之处,首先,抽样标本来自华西医院就诊的骨质疏松患者中符合条件的自愿受试者,具有就诊偏倚,而并非是完全随机样本。其次,检测样本数量较少,共 237 份,男性(25 份)所占比例低,如果扩大样本数量,对尽可能多的样本进行检测,其结果将更有意义。本次实验检测的结果和日本、韩国和国内的一些学者检测的结果相同,而和西方国家的一些学者在白种人中检测的结果迥异。由此,我们或许可以推断, COL1A1 基因多态性位点的分布频率在不同地区、种族的人群中差异很大,其中在白种人中广泛存在(s 等位基因频率约 15%~25%)的 Sp1 位点多态性可能在亚洲人,尤其是东方人中罕见或不存在。

骨质疏松症是一种多因素、多基因的疾病,受到遗传、环境、全身激素和局部细胞因子等的多重影响。近来,又发现 COL1A1 基因启动子内新的多态性位点 PCOL2(-1997G/T)和 PCOL1(-1663indelT)^[16],其中 PCOL2 多态性在西班牙人群、美国白人及中国汉族人群均有检出^[17-19],该位点位于 I 型胶原基因前启动子区域,含有体内表达所必需的顺式作用元件,电泳迁移率变动分析(electrophoretic mobility shift assays, EMSA)研究表明 PCOL2 多态位点能够与成

骨细胞核蛋白结合,因此推测对 COL1A1 基因的表达可能起调控作用^[19]。其在 I 型胶原的形成和代谢中的作用以及与骨质疏松症的相关性是否比 Sp1 位点多态性具有更重要的意义,还需要进一步研究。

致谢 本实验受到四川大学华西医院骨密度测定室和四川大学华西分子遗传学实验室大力支持,特别感谢付出大量辛勤劳动的夏庆杰教授、伍援朝老师和张发强等实验师

【参 考 文 献】

- [1] Xue Yan. The epidemiological overview of osteoporosis. New Chinese Medicine, 2007, 38(1): 7-8 (in Chinese).
- [2] Grant SF, Reid DM, Blake G, et al. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene. Nat Genet, 1996, 14(2): 203-205.
- [3] Roux CDM, Abel L, Mweier G, et al. Association of a polymorphism in the collagen I α_1 gene with osteoporosis in French women. Arthritis Rheum, 1998, 41(1): 187-188.
- [4] Weichetova M, Stepan JJ, Michalska D, et al. COL1A1 polymorphism contributes to bonemineral density to assess prevalent wrist fractures. Bone, 2000, 26(3): 287-290.
- [5] Braga V, Mottes M, Mirandola S, et al. Association of CTR and COL1A1 alleles with BMD values in 60 peri- and postmenopausal women. Calcif Tissue Int, 2000, 67(5): 361-366.
- [6] Uitterlinden AG, Burger H, Huang WJ, et al. Relation of alleles of the collagen type I alpha 1 gene to bone density and the risk of osteoporosis fracture in postmenopausal women. N Engl J Med, 1998, 338(15): 1016-1021.
- [7] Han KO, Moon IG, Kang YS, et al. Lack of an intronic Sp1 binding-site polymorphism at collagen type I gene in healthy Korean women. Bone, 1999, 24(2): 135-137.
- [8] Liden M, Wilen B, Ljunghall S, et al. Polymorphism at the Sp1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene does not predict bone mineral density in postmenopausal women in Sweden. Calcif Tissue Int, 1997, 63(4): 293-295.
- [9] Heegaard A, Jorgensen HL, Vestergaard AW, et al. Lack of influence of collagen type I alpha 1 Sp1 binding site polymorphism on the rate of bone loss in a cohort of postmenopausal Danish women followed for 18 years. Calcif Tissue Int, 2000, 66(6): 409-413.
- [10] Mann V, Hobson EE, Li B, et al. A COL1A1 Sp1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality. J Clin Invest, 2001, 107(7): 899-907.
- [11] Pluijm SM, van Essen HW, Bravenboer N, et al. Collagen type I alpha 1 Sp1 polymorphism, osteoporosis, and intervertebral disc degeneration in older men and women. Ann Rheum Dis, 2004, 63(1): 71-77.
- [12] McClean E, Archbold GP, Taggart HM. Do the COL1A1 and Taq 1 vitamin D receptor polymorphisms have a role in identifying individuals at risk of developing osteoporosis. Ulster Med J, 2003, 72(1): 26-33.
- [13] TAO J, XU YW, ZHENG X, et al. Relationship between the

- polymorphism of collagen I alpha 1 gene and primary osteoporosis. Chinese Journal of Osteoporosis, 2004, 10(1) 42-44 (in Chinese).
- [14] Deng ZL, Ran JW, Huang CL, et al. Relationship between the polymorphism at Sp1 binding site of the collagen I alpha 1 gene and osteoporosis of Han individuals. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2004, 8(11) :2058-2059(in Chinese).
- [15] Liu JM, Zhu HM, Song HD, et al. No-association between the polymorphism of collagen type I alpha 1 gene and bone mineral density of postmenopausal women in Shanghai. Chin J Endocrinol Metab, 2001, 17(4) 232-234 (in Chinese).
- [16] Garcia-Giralt N, Nogues X, Enjuanes A, et al. Two new single-nucleotide polymorphisms in the COL1A1 upstream regulatory region and their relationship to bone mineral density. J Bone Miner Res, 2002, 17(3) :384-393.
- [17] Liu PY, Lu Y, Long JR, et al. Common variants at the PCOL2 and Sp1 binding sites of the COL1A1 gene and their interactive effect influence bone mineral density in Caucasians. J Med Genet, 2004, 41(10) 752-757.
- [18] Zhang YY, Lei SF, Mo XY, et al. The -1997 G/T polymorphism in the COL1A1 upstream regulatory region is associated with hip bone mineral density (BMD) in Chinese nuclear families. Calcif Tissue Int, 2005, 76(2) :107-112.
- [19] Garcia-Giralt N, Enjuanes A, Bustamante M, et al. *In vitro* functional assay of alleles and haplotypes of two COL1A1-promoter SNPs. Bone, 2005, 36(5) 902-908.

(收稿日期:2008-01-18)