·论著·

褪黑素受体 1B 基因与青少年特发性脊柱侧凸患者骨密度的相关性

邱旭升 邓亮生 杨晓恩 郑振耀 邱勇

中图分类号：R682.3 文献标识码：A 文章编号：1006-7108(2009)01-0023-04

摘要：目的 探讨褪黑素受体 1B 基因(MTNR1B)多态性与青少年特发性脊柱侧凸(AIS)患者骨密度之间的相关性。**方法** 选取 511 例年龄在 12～18 岁之间的女性 AIS 患者，采用双能 X 线骨密度吸收仪测量优势侧近端股骨的骨密度。同时，采取患者外周静脉血，采用试剂盒提取 DNA。通过 PCR-RFLP 的方法检测 MTNR1B 基因启动子区上 2 个基因多态性位点的基因型。采用 ANOVA 的统计学方法比较不同基因型对应骨密度大小。**结果** MTNR1B 基因 2 个多态性位点各基因型所对应的骨密度差异无显著性($P>0.05$)。**结论** MTNR1B 基因多态性与 AIS 患者的骨密度之间没有相关性，它可能在 AIS 患者的低骨量中不发挥作用。

关键词：褪黑素受体 1B；基因多态性；骨密度；青少年特发性脊柱侧凸

Association between melatonin receptor 1B gene polymorphisms and bone mineral density in adolescent idiopathic scoliosis

QIU Xusheng, *DENG Liangsheng*, *YANG Xiaoen*, *et al*. *Spine Surgery*, *The Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School*, *Nanjing* 210008, China

Abstract: Objective To investigate the association between melatonin receptor 1B (MTNR1B) gene polymorphism and bone mineral density in adolescent idiopathic scoliosis (AIS). **Methods** 511 female AIS patients aged 12～18 years were recruited for this study. Bone mineral density (BMD) measurements of the dominant proximal femora were performed by dual energy X-ray absorptiometry (DXA). Peripheral bloods were collected, and genomic DNAs were extracted using a commercial available kit. Two SNPs (rs4753426 and rs7941837) in the promotor region of MTNR1B gene were genotyped using PCR-RFLP method. ANOVA was used for the comparison of bone mineral density of different genotypes. **Results** No differences in BMD were found with different genotypes for these two SNPs in AIS patients. **Conclusion** No association is found between the polymorphisms of MTNR1B gene and bone mineral density in AIS patients. The results suggested that genetic variation in MTNR1B gene maybe not involved in the pathogenesis of lower BMD in AIS patients.

Key words: Melatonin receptor 1B gene; Polymorphism; BMD; Adolescent idiopathic scoliosis

青少年特发性脊柱侧凸(adolescent idiopathic scoliosis，AIS)患者的低骨量被广泛报道[1-4]，但是其原因并不清楚。我们先前的研究发现褪黑素受体 1B 基因(melatonin receptor 1B，MTNR1B)启动子区的两个基因多态性位点与 AIS 的发病相关[5]。同时，有文献报道褪黑素在老年人骨质疏松的发病中起作用，它与骨量积累及骨密度有着密切的关系[6-8]。因此，我们推测 MTNR1B 基因启动子区的多态性可能会影响 AIS 患者骨量的积累，从而与 AIS 患者的低骨量有关。因此，笔者旨在探讨 MTNR1B 基因启动子区的多态性是否与 AIS 患者的骨密度相关。

1 资料和方法

1.1 研究对象

本研究包括 511 例女性 AIS 患者，年龄 12～18 (16.0±2.0)岁。AIS 患者通过前屈试验及前后位 X 线平片确诊，排除先天性脊柱侧凸，神经肌源性脊柱

基金项目：香港研资局基金资助项目(CUHK4337/04M)；江苏省国际科技合作项目(BZ2007024)；江苏省自然科学基金资助项目(BK2007203)

作者单位：210008 南京大学医学院附属鼓楼医院骨科(邱旭升、邱勇)；香港中文大学病理化学系(邓亮生)；香港中文大学医学院矫形外科及创伤学系(杨晓恩、郑振耀)

通讯作者：邱勇，Email：scoliosis2002@sina.com

侧凸，结缔组织病、骨软骨发育不良或者内分泌疾病伴发的脊柱侧凸，以及已接受治疗的脊柱侧凸。

本研究患者和正常对照本人及其家长签署同意书，同时本课题获得医院伦理委员会批准通过。

1.2 骨密度测量

采用双能 X 线骨密度吸收仪（XR-36，Norland Medical System Inc.，Fort Atkinson，Wisonsin，USA）测量双侧近端股骨的骨密度（bone mineral density，BMD）。仪器由专人操作，每日开机后均用体模矫正。按照事先本中心髋部扫描的测量误差是 1.5%[9]。股骨颈的 BMD，通过扫描区总的骨量（g）除以扫描的骨面积（cm^2）得到，单位是 g/cm^2。AIS 患者骨密度值经同年龄组正常青少年（当地中小学生）骨密度矫正成 z 值，同年龄组青少年的骨密度 z 值定义为 0。

1.3 基因型鉴定

采取外周血 3 ml，基因组 DNA 采用试剂盒（Roche，USA）提取，具体操作步骤参照说明书。由于我们先前的研究发现 MTNR1B 基因启动子区的 2 个基因多态性位点（rs4753426、rs7941837）与 AIS 的发病相关[5]，因此本研究就选取了这 2 个多态性位点作为研究对象，了解它们与 AIS 患者骨密度之间的相关性。

我们采用 PCR-RFLP 的方法对所选取的 SNPs 进行基因分型。表 1 列出了 PCR 反应扩增包含这些 SNPs 片段时所用的引物，退火温度，PCR 反应产物的大小，以及所用的内切酶和酶切后限制性片段大小。每一个 PCR 反应（最终反应物总体积 12.5 ml）包括 MBI Taq 酶 0.3 U，引物 1.0 ml，20 mmol/L Tris-HCl（pH 8.4），50 mmol/L KCl 以及 2.0 mmol/L $MgCl_2$，总共进行 35 个循环，每个循环包括 96℃ 30 s，60℃ 45 s，72℃ 30 s 三步，最后在 72℃ 延伸 10 min。取 7 μl PCR 反应产物，加入 3 U 相应的限制性内切酶及缓冲溶液（表 1），并加水使最终体积为 14 μl，在每一个限制性内切酶相对应的最佳反应温度下，酶切过夜。酶切产物经 2% 或者 4% 琼脂糖（根据片段大小决定采用哪种浓度的琼脂糖）电泳分离，溴化乙锭染色，紫外灯下判断限制性片段长度多态性，以确定基因型（图 1）。10% 的样本进行了重复试验，以保证基因型鉴定的准确性。

表 1 PCR-RFLP 反应条件及限制性片段大小

多态性位点	引物序列	退火温度（Tm，℃）	PCR 产物（bp）	内切酶	限制性片段（bp）
rs4753426	上游引物：AACATATTTGTGATTAATCCAGGC	58	127	Hae III	T：127
	下游引物：TAACACCTGCAATTTCCACC				C：104 + 23
rs7941837	上游引物：ACTGTATCCATAATTTTGCCTTTTC	60	139	EcoNI	A：139
	下游引物：AGCCATGATGCCATGAACCC				T：115 + 24

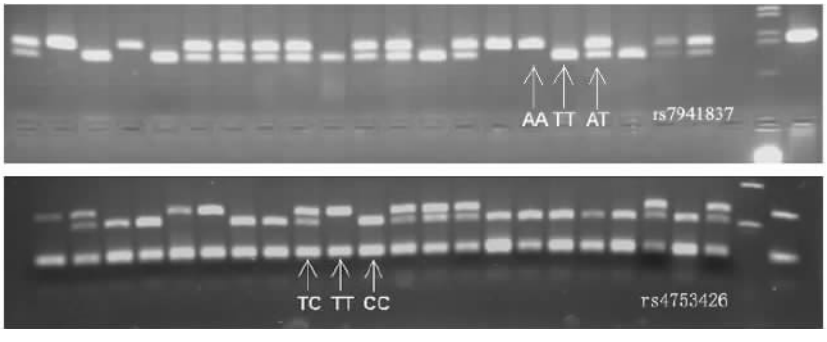

图 1 MTNR1B 基因 2 个 SNP 位点电泳图

左边第 1 道为酶切前的 PCR 产物，左边第 2 道是标准参照物，其余各个泳道是每个样本的显影结果。图中分别标出其中了 3 个泳道的结果，分别是 2 个 SNP 3 个基因型的显像结果

1.4 统计学处理

等位基因频率采用 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律进行检验,了解各基因频率是否为遗传平衡,具有群体代表性。不同基因型所对应骨密度的比较采用单因素 ANOVA 检验方法,以 $P < 0.05$ 为差异显著。所有数据统计均采用 SPSS 13.0 进行分析。

2 结果

2.1 AIS 患者的骨密度

AIS 患者的平均骨密度 z 值为 -0.29 ± 0.97,显著低于正常青少年的骨密度($P < 0.01$)。

2.2 MTNR1B 基因多态性位点频率分布情况

MTNR1B 各多态性位点基因型频率分布情况如表 2 所示。MTNR1B 基因 2 个多态性位点的基因型分布都符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律。rs4753426, rs7941837 位点分别以 CC(51.5%), AT(49.8%)基因型所占比例最高。

表 2 MTNR1B 基因各多态性位点基因型频率分布情况

多态性位点	n	基因型	频数	频率(%)
rs4753426	140	TT	34	6.7
		TC	214	41.9
		CC	263	51.5
rs7941837	130	AA	100	20.4
		AT	244	49.8
		TT	146	29.8

2.3 MTNR1B 基因多态性与骨密度相关性分析

MTNR1B 基因 2 个多态性位点各基因型所对应骨密度情况如表 3 所示。从表中可以看到,MTNR1B 基因 2 个多态性位点,每个位点各基因型所对应的骨密度差异都无统计学意义($P > 0.05$)。

表 3 MTNR1B 基因多态性与 AIS 患者骨密度的相关性

多态性位点	AIS		
	基因型	n	平均值 ± 标准差
rs4753426	TT	34	-0.41 ± 0.84
	TC	214	-0.24 ± 0.97
	CC	263	-0.27 ± 0.99
	Total	511	$P = 0.65$
rs7941837	AA	100	-0.27 ± 1.04
	AT	244	-0.27 ± 0.94
	TT	146	-0.28 ± 0.99
	Total	490	$P = 0.99$

注:表中所列骨密度值为经过同年龄组正常青少年骨密度矫正的 z 值

3 讨论

近年来有许多学者开始研究 AIS 患者的骨量,研究发现 AIS 患者存在低骨量。Burner 等[3] 在 1982 年首次报告 AIS 患儿有骨密度下降。Cook 等[2] 测定 AIS 患儿腰椎及股骨近端骨质密度,并与年龄性别相同的正常儿童比较,发现女性 AIS 患儿骨密度明显下降。近几年来,Cheng 和 Guo[1] 采用 DEXA(Dual-energy X-ray Absorptiometry)对 81 例 AIS 女孩及 220 例同龄同性别正常儿童测定股骨近端骨密度及腰椎骨密度,发现 AIS 患儿比正常儿童的骨密度低,其中 68%的患儿降低明显。对 14 例 AIS 患者经过 3 年随访,发现这种骨密度低下是持续性的。吴洁等[4] 的研究也表明 AIS 所测腰椎及股骨近端的骨密度均明显低于正常对照组($P < 0.05$),腰椎骨密度的降低比股骨明显,股骨近端的 3 个部位,以 Ward's 三角的骨密度降低尤为显著。按诊断标准 z 值为患者骨密度与正常同年龄对照组平均骨密度的差距,低于 1.0 *SD* 以内为骨量正常,低于 1.0 ~ 2.0 *SD* 之间诊断为骨量减少,低于 2.0 *SD* 以上诊断为骨质疏松。AIS 组所测的腰椎骨密度显示有 26.7%的患者发生骨量减少,48.5%符合骨质疏松的诊断标准;股骨颈有 26.7%的患者发生骨量减少,25.7%达到骨质疏松的诊断标准,大转子有 20.8%的患者发生骨量减少,26.7%达到骨质疏松的诊断标准,Ward's 三角有 31.7%的患者发生骨量减少,33.7%符合骨质疏松的诊断标准。对 AIS 骨组织形态学进一步研究[10],探讨骨代谢再塑过程,发现 AIS 患者骨小梁是连续细长的,骨小梁厚度降低,骨小梁表面的类骨质减少,骨细胞数量也有减少,骨形成不活跃,少见成骨细胞。骨密度与骨组织形态学的研究初步揭示了 AIS 患者有骨异常代谢及生长紊乱。

虽然 AIS 患者的低骨量逐渐被人们认识,但是其具体机制还不清楚。我们希望在 AIS 病因学研究中寻找到 AIS 患者低骨量研究的突破口。在 AIS 众多病因学研究中,褪黑素的研究是其中的一个热点。褪黑素与脊柱侧凸之间的关系最早源于 1959 年 Thillard[11] 的一个意外发现,他发现松果体切除可以导致新生小鸡脊柱畸形的发生。由于褪黑素是松果体分泌的主要激素,因此,血清褪黑素水平低下与脊柱侧凸发生之间是否有着必然联系引起了研究者的广泛兴趣。此后,日本学者 Machida 等[12] 及其他一些学者同样也证实了松果体切除小鸡可以导致脊柱侧凸的发生,并且 Machida 还发现肌肉内移植松果

体[13]或者腹腔内注射褪黑素[14]都可以阻止松果体切除小鸡脊柱侧凸的发生。同时 Moreau 等[15]还研究 AIS 患者的褪黑素信号传导通路。其研究结果表明 AIS 患者的褪黑素信号传导通路存在异常,并且认为这种异常可能与 Gi 蛋白(inhibitory guanine nucleotide-binding protein)过度磷酸化有关。另外,我们先前的研究表明褪黑素受体 1B(MTNR1B)启动子区基因多态性与 AIS 的发病相关[5]。

同时,近来褪黑素与骨质疏松之间关系受到越来越多人的关注。Ladizesky 等[6]通过切除卵巢的小鼠实验,第 1 次证实在体内褪黑素可以减少骨丢失。Ladizesky 等[16]的研究同样表明,在一定浓度雌激素条件下,药理剂量褪黑素可以阻止卵巢切除术后的异常骨重建。另外,有体外试验直接证明褪黑素对成骨细胞及破骨细胞的作用。Roth 等[8]的研究直接检测到了褪黑素对成骨细胞的前体细胞及鼠的成骨样骨肉瘤细胞系的作用。成骨细胞前体细胞在 50 nM 的褪黑素的刺激下,细胞分化加速。两个细胞系在纳摩级的褪黑素作用下,骨涎(唾液)蛋白及其他的骨标志性蛋白如碱性磷酸酶、骨桥蛋白及骨钙素表达增加。Nakade 等[7]的研究表明,褪黑素可以显著的促进人的骨细胞及人的成骨细胞系细胞的增殖,并且呈剂量依赖性,当褪黑素浓度为 50 nmol/L 时,达到最大效应。另一个实验研究表明,在鼠的 MC3T3-E1 成骨细胞系中,褪黑素(5 ~ 500 μmol/L)呈剂量依赖性的降低 RANK mRNA 的表达,增加 OPG mRNA 及蛋白的表达。笔者因此认为,药理剂量的褪黑素,通过下调 RANK 介导的破骨细胞的形成和活性而使骨吸收减少,骨量增加[17]。事实上,最近有学者提出将褪黑素作为治疗骨质疏松的一种药物。

基于以上的事实,我们推测褪黑素可能与 AIS 的低骨量有关。由于我们先前的研究表明褪黑素受体 1B(MTNR1B)启动子区基因多态性与 AIS 的发病相关[5],因此,我们进一步探讨了褪黑素受体 1B(MTNR1B)基因多态性与 AIS 患者骨密度的相关性。研究结果表明 MTNR1B 受体上 2 个多态性位点都与骨密度没有相关性。这提示导致 AIS 发病的因素并不一定同时与 AIS 的低骨量相关。AIS 的低骨量值得我们进一步研究。

【参考文献】

[1] Cheng JC, Guo X. Osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis. A primary problem or secondary to the spinal deformity? Spine, 1997, 22(15): 1716-1721.

[2] Cook SD, Harding AF, Morgan EL, et al. Trabecular bone mineral density in idiopathic scoliosis. J Pediatr Orthop, 1987, 7(2): 168-174.

[3] Burner WL 3rd, Badger VM, Sherman FC. Osteoporosis and acquired back deformities. J Pediatr Orthop, 1982, 2(4): 383-385.

[4] 吴洁, 邱勇, 孙燕芳, 等. 青少年特发性脊柱侧凸患者骨密度变化的分析. 中国脊柱脊髓杂志, 2004, 14(10): 598-600.

[5] Qiu XS, Tang NL, Yeung HY, et al. Melatonin receptor 1B (MTNR1B) gene polymorphism is associated with the occurrence of adolescent idiopathic scoliosis. Spine, 2007, 32(16): 1748-1753.

[6] Ladizesky MG, Cutrera RA, Boggio V, et al. Effect of melatonin on bone metabolism in ovariectomized rats. Life Sci, 2001, 70(5): 557-565.

[7] Nakade O, Koyama H, Ariji H, et al. Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells *in vitro*. J Pineal Res, 1999, 27(2): 106-110.

[8] Roth JA, Kim BG, Lin WL, et al. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. J Biol Chem, 1999, 274(31): 22041-22047.

[9] Cheng JC, Qin L, Cheung CS, et al. Generalized low areal and volumetric bone mineral density in adolescent idiopathic scoliosis. J Bone Miner Res, 2000, 15(8): 1587-1595.

[10] Cheng JC, Tang SP, Guo X, et al. Osteopenia in adolescent idiopathic scoliosis: a histomorphometric study. Spine, 2001, 26(3): E19-E23.

[11] Thillard MJ. Deformation de la collone vertebrale consecutives a lepiphysictomie chez le poussin. Extrait des Comptes Rendus de l'Association des Anatomistes, 1959, 46(1): 22-26.

[12] Machida M, Dubousset J, Imamura Y, et al. Role of melatonin deficiency in the development of scoliosis in pinealectomised chickens. J Bone Joint Surg Br, 1995, 77(1): 134-138.

[13] Machida M, Dubousset J, Imamura Y. Pathogenesis of idiopathic scoliosis: SEPs in chickens with experimentally induced scoliosis and patients with idiopathic scoliosis. J Pediatr Orthop, 1994, 14: 329-335.

[14] Machida M, Miyashita Y, Murai I, et al. Role of serotonin for scoliotic deformity in pinealectomized chicken. Spine, 1997, 22(12): 1297-1301.

[15] Moreau A, Wang DS, Forget S, et al. Melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis. Spine, 2004, 29(16): 1772-1781.

[16] Ladizesky MG, Boggio V, Albornoz LE, et al. Melatonin increases oestradiol-induced bone formation in ovariectomized rats. J Pineal Res, 2003, 34(2): 143-151.

[17] Koyama H, Nakade O, Takada Y, et al. Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation. J Bone Miner Res, 2002, 17(7): 1219-1229.

(收稿日期:2008-11-28)