

维生素 D 受体基因 Apa I 多态性与终末期肝病患者骨代谢的相关性研究

陈琳 盛正妍 游利 陈瑾瑜 王煜非 彭志海 徐军明

中图分类号: R591.44 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)01-0040-04

摘要:目的 探讨维生素 D 受体(VDR)基因 Apa I 位点多态性与终末期肝病患者骨代谢的关系。方法 选择 72 例终末期肝病患者,并以 50 例原发性骨质疏松和骨量减少患者作为对照组。采用聚合酶链反应和限制性片段长度多态性技术(PCR-RFLP)检测 VDR 基因 Apa I 位点多态性,双能 X 线吸收仪(DXA)检测腰椎(L₁₋₄)及股骨颈骨密度(BMD),并检测骨代谢相关指标,包括甲状旁腺激素(PTH)、骨钙素(BGP)、血钙(Ca)、血磷(P)、尿钙(uCa)、尿肌酐(uCr)。结果 ①Apa I 多态性等位基因频率分布符合 Hardy-Weinberg 定律,终末期肝病组基因型分布为 AA(12.5%)、Aa(34.7%)、aa(52.8%);对照组基因型分布为 AA(10.0%)、Aa(36.0%)、aa(54.0%)。基因型分布频率两组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。②终末期肝病组中,Apa I 基因型与 L₁₋₄及股骨颈 BMD 相关($P < 0.01$),AA 基因型 L₁₋₄及股骨颈的 BMD 显著高于 aa 型($P < 0.05$)。对照组中,Apa I 基因型与 L₁₋₄及股骨颈 BMD 均无明显相关性。③终末期肝病组中,Apa I 基因型与 BGP 水平相关,AA 基因型的 BGP 水平高于 aa 型($P < 0.05$);Apa I 基因型与 PTH、血 Ca、血 P 及 uCa/Cr 水平差异无统计学意义。结论 终末期肝病患者 VDR 基因 Apa I 位点多态性与 BMD 及 BGP 水平均相关,Apa I 位点多态性与终末期肝病患者骨代谢存在相关性。

关键词:受体;基因;骨密度;维生素 D;肝性骨病

Association of Apa I polymorphism of vitamin D receptor gene with bone metabolism in patients with end-stage liver disease CHEN Lin, SHENG Zhengyan, YOU Li, et al. Department of Osteoporosis, Shanghai Jiaotong University Affiliated No.1 People's Hospital, Shanghai 200080, China

Abstract: **Objective** To investigate the association of Apa I polymorphism of vitamin D receptor(VDR) gene with bone metabolism in patients with end-stage liver disease. **Methods** The VDR genotype was determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) in 72 patients with end-stage liver diseases and 50 patients with primary osteoporosis(OP) or osteopenia. Bone mineral density(BMD) at lumbar spine 1~4(L₁₋₄) and femoral neck(Neck) were measured by dual-energy X-ray absorptiometry(DXA). The serum level of parathyroid hormone(PTH), osteocalcin(BGP), calcium(Ca), phosphate(P), urinary calcium(uCa) and urinary creatinine(uCr) were also detected in these patients. **Results** (1) Frequencies of aa, Aa and AA genotype were 52.78%, 34.72% and 12.50% in the end-stage liver disease group, and 54.00%, 36.00% and 10.00% in the control group, respectively. The allele frequencies of Apa I polymorphism were in Hardy-Weinberg equilibrium. There was not significant difference in the frequency distribution of VDR genotype between two groups($P > 0.05$). (2) Significant association was found between VDR Apa I genotype and BMD at L₁₋₄ and Neck($P < 0.05$) in the group of end-stage liver disease. Compared with aa genotype, AA genotype had significantly higher mean BMD at L₁₋₄ and Neck($P < 0.05$, $P < 0.05$). Significant association was found between VDR Apa I genotype and BMD at L₁₋₄ and Neck($P < 0.05$, $P < 0.01$) in subgroup of patients with osteoporosis or osteopenia. Compared with aa, Aa genotype had significantly higher mean BMD at L₁₋₄($P < 0.05$) and compared with Aa and aa, AA genotype had significantly higher mean BMD at Neck($P < 0.01$, $P < 0.001$).

No significant difference was found between Apa I genotype and BMD at L_{4-4} and Neck in the control group. (3) Significant association was found between VDR Apa I genotype and the serum level of BGP in the group of end-stage liver disease and its subgroup of osteoporosis or osteopenia. Compared with aa genotype, AA genotype had significantly higher mean serum BGP level ($P < 0.05$). But Apa I genotype is not associated with serum level of PTH, Ca, P and uCa/Cr. **Conclusions** Apa I genotype polymorphism is associated with BMD and the serum level of BGP in patients with end-stage liver disease. So it is associated with bone metabolism in patients with end-stage liver disease.

Key words: Receptor; Gene; Bone mineral density (BMD); Vitamin D; Hepatic bone disease

慢性肝病可引起骨代谢异常,导致肝性骨病 (hepatic bone disease, HBD),以骨质疏松多见 (osteoporosis, OP)。有研究显示,等待肝移植患者的腰椎或髌部骨质疏松发生率为 36.6%,骨量减少为 48%,而骨量正常的患者只占 15% 左右,男女间没有差异^[1]。HBD 的发病机制尚未完全阐明,除环境因素外,遗传因素可能也参与其发生、发展。维生素 D 受体 (vitamin D receptor, VDR) 基因与骨密度 (bone mineral density, BMD) 骨转换存在一定关联,是目前国际上最受关注,也是最受争议的一个候选基因,但研究主要涉及原发性骨质疏松患者。而且,目前慢性肝病合并骨质疏松的研究主要集中在钙-甲状旁腺激素-维生素 D 轴的异常,而 VDR 基因多态性在终末期肝病合并骨质疏松中的作用尚无系统的研究。本研究选择等待移植的终末期肝病患者作为研究对象,旨在探讨终末期肝病患者 VDR 基因多态性与骨代谢的关系。

1 对象和方法

1.1 患者入选及分组

1.1.1 终末期肝病组 选择 2005 年 6 月~2006 年 12 月于上海市第一人民医院肝移植中心等待移植的住院患者 72 例并征得患者同意,所有患者均为无亲缘关系汉族人群。Child-Pugh 肝功能分级均为 C 级,其中男性 38 例,女性 34 例。年龄 27~67 岁,平均年龄 (51.2 ± 7.8) 岁。并排除其他各种骨代谢疾病、心肺疾病、糖尿病、甲亢等内分泌代谢疾病、血液病、肾功能正常;未使用过影响骨代谢的药物,如二膦酸盐类、激素等。

1.1.2 对照组 选择 2005 年 6 月~2006 年 12 月于上海市第一人民医院骨质疏松门诊初诊患者 50 例并征得患者同意,所有患者均为无亲缘关系汉族人群。依据 WHO 骨质疏松诊断标准,达到骨量减少或骨质疏松标准的均纳入该组。其中男性 22 例,女性 28 例。年龄 37~68 岁,平均年龄 (53.6 ± 6.5) 岁。并排除其他各种骨代谢疾病、心肺疾病、内分泌代谢

疾病、血液病、肝、肾功能正常;未使用过影响骨代谢的药物。

1.2 实验方法

1.2.1 基因型检测 采用 DNA_{fast2000} 试剂盒 (飞捷生物技术有限公司) 从全血中抽提基因组 DNA。维生素 D 受体基因 Apa I 位点序列上游引物: 5'-CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA-3', 下游引物: 5'-TGGCGGCAGCGGATGTACGTCTGC-3'。以 200 ng DNA 为模板,在 50 μ l 体系内进行 PCR 扩增 (PTC-220 型高通量 PCR 仪, MJ Research), 循环条件 95 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 40 s, 58 $^{\circ}$ C 40 s, 32~35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 7 min。取扩增产物 4 μ l 于 20 μ l 体系中进行限制性内切酶酶切反应 (Apa I 酶切试剂盒, TaRaKa) 37 $^{\circ}$ C 水浴 8 h 后,取酶切产物 5 μ l 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,于凝胶图像分析系统下分析基因型。缺乏相应酶切位点为 AA 型 (740 bp 1 条带), Aa 型 (740 bp, 520 bp, 220 bp 3 条带) 为杂合子, aa 型 (520 bp, 220 bp 2 条带) 代表存在相应酶切位点的基因型。

1.2.2 临床检查 所有患者测定正位脊柱 (L_{1-4}) 和左侧股骨颈 (Neck) BMD (Prodigy 型 DXA, GE LUNAR)。并同时检测骨代谢相关指标,包括:血清甲状旁腺激素 (PTH)、血清骨钙素 (BGP) (E170 型电化学发光仪,德国罗氏)、血钙 (Ca)、磷 (P)、尿钙 (uCa)、尿肌酐 (uCr) (ADVIA 1650 型自动生化分析仪)。根据公式进行 uCa 与 uCr 比值计算: $uCa/Cr = 1000 \times uCa (\text{mmol/L}) / uCr (\mu\text{mol/L})$ 。

1.2.3 统计学处理 基因频率采用基因计数法计算, VDR Apa I 等位基因频率采用 χ^2 检验分析是否符合 Hardy-Weinberg 定律;基因型构成比用 χ^2 检验。组间计量资料比较用 t 检验或单因素方差分析;多组间两两比较,方差齐性时采用 S-N-K 法,方差不齐时采用 Dunnett's 法。用协方差分析经年龄调整过的 BMD 与各基因型的关系。计数资料采用 χ^2 检验。采用 SPSS 11.5 统计软件包完成上述

分析。

2 结果

2.1 终末期肝病组 BMD 变化

终末期肝病组中 ,骨量减少及骨质疏松发生率为 62.5%(45/72) ,其中骨质疏松发生率为 47.2%(34/72)。终末期肝病组年龄、性别构成比与对照组差异均无统计学意义($P > 0.05$)。终末期肝病组与对照组相比 , L_{1-4} 、股骨颈 BMD 差异无统计学意义($t = 0.587$, $P = 0.558$; $t = 0.993$, $P = 0.323$)。

2.2 VDR 基因型和等位基因分布频率及 VDR 基因 Apa I 多态性 PCR-RFLP 结果

VDR Apa I 基因型在终末期肝病组和对照组中的分布符合 Hardy-Weinberg 定律($\chi^2 = 2.098$, $P > 0.05$; $\chi^2 = 0.574$, $P > 0.05$)。两组 AA、Aa、aa 基因型及 A、a 等位基因分布无明显差异($P > 0.05$)(表 1)。VDR 基因 Apa I 多态性 PCR-RFLP 结果见图 1。

表 1 VDR 基因型和等位基因分布(例,%)

组别	基因型			等位基因	
	AA	Aa	aa	A	a
终末期肝病组	9(12.5)	25(34.7)	38(52.8)	43(29.9)	101(70.1)
对照组	5(10.0)	18(36.0)	27(54.0)	28(28.0)	72(72.0)

2.3 Apa I 基因多态性与 BMD 关系

经年龄、体重调整后的协方差分析提示 ,对照组 L_{1-4} 及股骨颈 BMD 与 Apa I 基因多态性无相关($F = 0.849$, $P > 0.05$; $F = 0.776$, $P > 0.05$)。终末期肝病组患者 L_{1-4} 及股骨颈 BMD 与 Apa I 基因多态性相关($F = 4.758$, $P < 0.05$; $F = 3.862$, $P < 0.05$)。AA 基因型 L_{1-4} 及股骨颈的 BMD 显著高于 aa 型(P

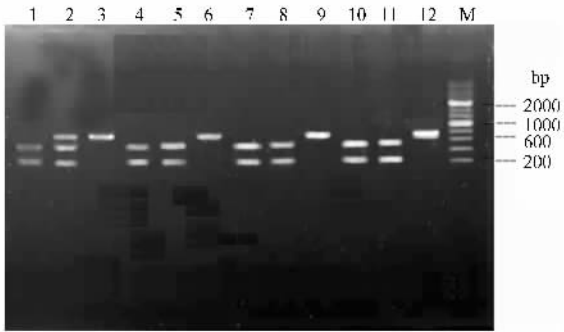


图 1 VDR 基因 Apa I 多态性 PCR-RFLP 结果
1、4、5、7、8、10、11 :aa 基因型 2 :Aa 基因型 3、6 :AA 基因型 9、12 :
PCR 反应产物 M 200 bp DNA Ladder 标准参照物

< 0.05 , $P < 0.05$) ,AA 与 Aa 基因型间 BMD 差异无显著性。终末期肝病组中骨量减少患者 L_{1-4} 及股骨颈 BMD 与 Apa I 基因多态性均相关($P < 0.05$; $P < 0.04$)。Aa 基因型 L_{1-4} 的 BMD 高于 aa 型($P = 0.015$) ,AA 与 Aa 基因型 L_{1-4} 的 BMD 差异无统计学意义 ;AA 基因型的股骨颈 BMD 高于 Aa 及 aa 型($P = 0.008$, $P < 0.01$) ,aa 型与 Aa 型股骨颈 BMD 差异无统计学意义(表 2)。

2.4 VDR 基因 Apa I 位点多态性与骨代谢生化指标的关系

终末期肝病患者及终末期肝病骨量减少患者 Apa I 位点多态性与 BGP 水平显著相关($F = 7.745$, $P = 0.001$; $F = 5.724$, $P = 0.006$) ,AA 基因型的 BGP 水平高于 aa 型($P < 0.05$)。Apa I 位点多态性与 PTH、血 Ca、P、uCa/Cr 水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)。对照组 Apa I 基因多态性与骨代谢生化指标水平差异均无统计学意义($P > 0.05$)(表 3)。

表 2 各组 VDR 各基因型 BMD 测定结果($\bar{x} \pm s$)

组别	Apa I 多态性	体重(kg)	年龄(岁)	L_{1-4} BMD(g/cm^2)	Neck BMD(g/cm^2)
对照组	AA	65.2 $\pm$ 2.1	60.8 $\pm$ 8.9	1.066 $\pm$ 0.266	0.759 $\pm$ 0.046
	Aa	68.7 $\pm$ 0.8	53.8 $\pm$ 5.9	1.017 $\pm$ 0.114	0.861 $\pm$ 0.142
	aa	62.9 $\pm$ 1.9	52.2 $\pm$ 5.7	0.980 $\pm$ 0.081	0.860 $\pm$ 0.086
终末期肝病组	AA	62.3 $\pm$ 2.7	47.6 $\pm$ 11.8	1.148 $\pm$ 0.159	0.991 $\pm$ 0.111
	Aa	57.5 $\pm$ 3.4	53.4 $\pm$ 6.1	1.036 $\pm$ 0.161	0.903 $\pm$ 0.224
	aa	59.3 $\pm$ 1.5	50.6 $\pm$ 7.5	0.975 $\pm$ 0.165	0.835 $\pm$ 0.136

表 3 VDR 各基因型骨代谢生化指标检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	基因型	Ca(mmol/L)	P(mmol/L)	uCa/Cr	PTH(pg/ml)	BGP(ng/ml)
对照组	AA	2.41 $\pm$ 0.05	1.33 $\pm$ 0.34	0.43 $\pm$ 0.12	25.82 $\pm$ 15.12	22.33 $\pm$ 9.73
	Aa	2.39 $\pm$ 0.20	1.39 $\pm$ 0.16	0.46 $\pm$ 0.18	25.69 $\pm$ 8.71	15.61 $\pm$ 6.08
	aa	2.43 $\pm$ 0.14	1.37 $\pm$ 0.16	0.48 $\pm$ 0.22	23.30 $\pm$ 6.38	20.00 $\pm$ 7.38
终末期肝病组	AA	2.22 $\pm$ 0.89	1.33 $\pm$ 0.09	0.28 $\pm$ 0.11	29.07 $\pm$ 14.50	17.47 $\pm$ 6.70
	Aa	2.14 $\pm$ 0.16	1.31 $\pm$ 0.11	0.37 $\pm$ 0.20	30.89 $\pm$ 20.00	12.12 $\pm$ 6.53
	aa	2.17 $\pm$ 0.20	1.32 $\pm$ 0.13	0.36 $\pm$ 0.16	37.96 $\pm$ 26.27	9.25 $\pm$ 5.00

3 讨论

维生素 D 是重要的骨代谢调节激素之一,通过作用于靶细胞核内高度特异性的 VDR 而发挥生物学作用。目前发现与骨代谢相关的 VDR 基因多态性位点为 Bsm I、Apa I、Taq I 及 Fork I 酶切位点,其中 Apa I 酶切位点位于第 8 内含子中。对高加索人的研究显示, A 等位基因频率占绝大多数^[2,3]。但是,赵金秀等^[4]发现中国人 VDR 多态性的分布频率明显不同于高加索人种,以 a 等位基因居多。黄琪仁等^[5]对男性维生素 D 受体基因 Apa I 多态性的研究发 a 等位基因频率为 70.2%,为优势基因。本研究结果与之较为一致。说明 VDR 基因多态性分布存在着明显的种族差异。

骨量主要受遗传因素的影响。据报道,骨量的 70% ~ 85% 是由遗传因素决定的^[6]。1994 年 Morrison 等^[2]通过对双胞胎及无关联的正常高加索人群研究,提出 VDR 基因多态性可预测 BMD 不同。随后世界各地掀起了研究 VDR 与骨代谢作用相关性的热潮,但研究结果并不一致^[7,8]。Apa I 酶切位点存在于 VDR 基因 3' 端非编码序列中,其多态性不影响 VDR 基因的功能,可能影响了该基因的转录活性和 mRNA 的稳定性,使 VDR 的质和量发生了微小的改变。且这种影响与其所在细胞的类型、分化阶段和活性状态有关^[9]。作为遗传标记的多态性,对骨量潜在作用的机制尚不明瞭,可能由于在生理和(或)病理情况下,其多态性所引起的微小差异被放大,从而影响骨密度。本研究未发现 Apa I 多态性与原发性骨质疏松患者之间的关系,但是 aa 基因型可能是终末期肝病患者骨量减少和骨质疏松发生的危险基因型,推测具有遗传易感性的肝病患者,组织对维生素 D 的敏感性降低,加之环境因素(如维生素 D、钙磷代谢紊乱、铜和胆盐代谢产物抑制成骨细胞功能、维生素 K 缺乏、低体重等)的作用,最终导致骨代谢异常。

VDR 是已知最可能调节 BGP 的基因,1,25(OH)₂D₃ 介导的 BGP 转化和表达是通过 VDR 上的 DNA 结合区和靶基因启动子附近的反应元件,即维生素 D 反应元件(vitamin D responsive element, VDRE)相互作用,从而改变局部的超螺旋状态而调节基因的表达来实现的。在体外细胞培养中,将 BGP 基因转染细胞,BGP 基因可被 VDR 激活,而激活的程度与细胞表面受体数量有关。1992 年, Morrison 等^[2]观察了 VDR 等位基因多态性与血清

BGP 的关系,结果发现,限制性内切酶 Bsm I 和 Apa I 等酶切位点产生不同的基因型,可以预测血清 BGP 水平。因此认为 VDR 基因的多态性可以预测骨转换。瑞典 Lorentzon 等^[10]也报道了 Apa I 表现的 VDR 基因多态性与血清 BGP 水平的差异有关。推测 VDR 基因多态性位点可能与某个位于 12 号染色体上对 BGP 基因起反相作用的反式因子不平衡连锁。本研究中,终末期肝病患者 Apa I 基因型与 BGP 水平显著相关, AA 和 Aa 基因型的 BGP 水平高于 aa 型。提示终末期肝病患者 VDR Apa I 基因多态性可预测骨转换,具有 aa 基因型的患者 BGP 水平低下,骨形成减少。原发性骨质疏松患者中却不存在这种联系,这可能和 BGP 的合成受肝功能的影响有关,需要进一步的研究明确。

肝病相关性骨病的发生机制其实相当复杂,有多种因素参与其中,想要真正完全了解是比较困难的。吕国良^[11]对于肝性骨质疏松症的发病机制进行了详细地综述,其中关于基因多态性和骨质疏松的关系尚研究较少,目前在流行病学方面也缺乏大规模的临床报道。本研究虽然发现了基因多态性和终末期肝病患者骨密度有相关性,但是由于本身病例数仍然较少,需要进一步加大样本量进行研究^[12]。另外,研究并未发现 VDR Apa I 基因多态性与血 Ca、P、PTH 及 uCa/Cr 等临床指标存在相关性,有可能这些指标在评价终末期肝病患者骨转换状态还存在不确定性,受到饮食、肝功能等影响,而 Apa I 多态性可能与其他特异性更强的骨吸收指标存在联系,这方面也需更进一步的研究。

【参 考 文 献】

- [1] Ninkovic M, Love SA, Tom B, et al. High prevalence of osteoporosis in patient with chronic liver disease prior to liver transplantation. *Calcif Tissue Int* 2001, 69(6):321-326.
- [2] Morrison NA, Qi JC, Tokita A, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature*, 1994, 367(6460):284-287.
- [3] Simmons JD, Mullighan C, Welsh KI, et al. Vitamin D receptor gene polymorphism: association with Crohn's disease susceptibility. *Gut* 2000, 47(2):211-214.
- [4] 赵金秀,周学瀛,孟迅吾,等.中国妇女维生素 D 受体基因与骨密度及骨钙素关系的研究. *中国医学科学院学报*, 1997, 19(4):252-256.
- [5] 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.

(上接第 43 页)

- [6] Jouanny P , Guiuemin F , Kuntz C , et al. Environmental and genetic factors affecting bone mass. Similarity of bone density among members of healthy families. *Arthritis & Rheumatism* , 1995 , 38(1) : 61-67.
- [7] Bell NH , Morrison NA , Nguyen TV , et al. Apa I polymorphism of the vitamin D receptor predict bone density of the lumbar spine and not racial difference in bone mineral density in young men. *J Lab Clin Med* , 2001 , 137(2) : 133-140.
- [8] Lau EM , Young RP , Ho SCH , et al. Vitamin D receptor gene polymorphism and bone mineral density in elderly Chinese men and women in Hong Kong. *Osteoporos Int* , 1999 , 10(3) : 226-230.
- [9] Uitterlinden GA , Fang Y , Berfink AP , et al. The role of vitamin D

receptor gene polymorphism in bone biology. *Mol Cell Endocrinal* , 2002 , 197(1-2) : 15-21.

- [10] Lorentzon M , Lorentzon R , Nordström P. Vitamin D receptor gene polymorphism is related to bone density , circulating osteocalcin , and parathyroid hormone in healthy adolescent girls. *J Bone Miner Metab* , 2001 , 19(5) : 302-307.
- [11] 吕国良.肝病相关性骨质疏松症. *新医学* , 2007 , 38(1) : 13-15.
- [12] Yokoyama S , Kasahara M , Fukuda A , et al. Successful living-donor liver transplantation for chronic hepatic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation for chronic granulomatous disease. *Transplantation* , 2008 , 86(2) : 367-368.

(收稿日期 2008-10-28)