·论著·

细胞色素 P4503A7 * 1c 基因多态性与蒙古族妇女骨质疏松的关系

张瑞芳 毕力夫 苏秀兰 张俊晶 赵灵燕

中图分类号：R589.5 文献标识码：A 文章编号：1006-7108(2009)02-0092-04

摘要：目的 探讨 CYP3A7 基因多态性与内蒙古地区蒙古族绝经妇女骨密度的关系。**方法** 应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态(PCR-RFLP)测定 185 名内蒙古地区健康绝经期妇女经 SspI 酶切后 CYP3A7 基因多态性，同时用双能 X 线吸收法测定前臂骨密度。**结果** 基因型频率分布依次为正常组 TT 型 84.4%，TG 15.0%，GG 0.7%，骨质疏松组 TT 型 71.1%，TG 26.3%，GG 2.6%，等位基因频率正常组 T 为 91.8%，G 为 8.2%；骨质疏松组 T 为 84.2%，G 为 15.8%。通过协方差分析，调整年龄、身高、体重、BMI，结果显示，CYP3A7 基因型与左前臂 BMD 有相关性($P<0.05$)。骨量减少组和骨量正常组间等位基因频率具有显著性差异($P<0.05$)，基因型频率无显著性差异($P>0.05$)。**结论** CYP3A7 基因型与蒙古族妇女前臂 BMD 有关联($P<0.05$)，可作为预测骨质疏松发生的危险性因素。

关键词：蒙古族妇女；骨质疏松症；CYP3A7 基因多态性；骨密度

The relationship between CYP3A7 polymorphisms and density in menopausal Mongolian women

ZHANG Ruifang, BI Lifu, SU Xiulan, et al. Department of Preventative Medicine, Inner Mongolia Medical College, Hohhot 010059, China

Abstract: Objective To explore the relationship between CYP3A7 polymorphisms and bone mineral density in menopausal Mongolian women in Inner Mongolia. **Methods** CYP3A7 polymorphisms defined by the SspI restriction enzyme using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism in 185 healthy menopausal Mongolian women in Inner Mongolia, forearm BMD were measured by dual energy X-ray absorptiometry. **Results** The frequency distribution of CYP3A7 genotype was normal group: TT 84.4%, TG 15.0%, GG 0.7%; Osteoporosis group: TT 71.1%, TG 26.3%, GG 2.6%. CYP3A7 allele frequency were normal group: T 91.8%, G 8.2%; Osteoporosis group: T 87%, G 13%, Covariance analysis showed significant association between CYP3A7 genotype and BMD at left forearm in all groups after adjusting age, body height, body weight and BMI. There was statistical significance between osteopenia group and control group in allele genes, but no statistical significance in genotype frequency. **Conclusions** Among Mongolian women in Inner Mongolia, CYP3A7 polymorphisms was associated with bone mineral density ($P<0.05$). It can be used to predict the risk of osteoporosis.

Key words: Mongolian women; Osteoporosis; CYP3A7 polymorphisms; Bone mineral density

骨质疏松症(Osteoporosis, OP)是以骨量减少和骨微结构异常为特征，致使骨脆性增加而易于发生骨折的一种全身性代谢性疾病，其患病率随年龄增长而增加，严重影响着中老年，特别是中老年妇女的健康。峰值骨量的达到和骨量的丢失均受遗传因素的影响，对影响骨代谢基因多态性的研究正日益深入，近年来国外开展了细胞色素 P4503A7 * 1c，CYP3A7 * 1c 基因多态性与骨密度(bone mineral density, BMD)关系的研究[1,2]，但是不同种族及地区的研究结果不尽相同。笔者探讨了 CYP3A7 * 1c 基因多态性与内蒙古地区绝经期妇女 BMD 的关系。

1 材料和方法

1.1 研究对象

185 例受试者来自内蒙古同一地区 5 年以上居

作者单位：010059 呼和浩特，内蒙古医学院临床医学研究中心(张瑞芳、苏秀兰)；内蒙古医学院预防医学教研室(毕力夫、赵灵燕)；内蒙古医学院第一附属医院外科(张俊晶)

通讯作者：毕力夫，Email：blf@hotmail.com；苏秀兰，Email：xls@sina.com

住史的 3 代纯系蒙古族妇女,所有对象均进行健康调查表填写、体格检查和实验室常规检查(血糖、尿糖、肝、肾功等)。排除影响骨代谢因素:肝肾功能不全者、长期服用影响骨代谢的药物及吸烟、酗酒者除外。OP 诊断标准采用世界卫生组织 1994 年提出的标准:骨量丢失 1 标准差为正常,丢失 1 ~ 2.5 标准差为骨量减少,丢失大于 2.5 标准差为 OP。在 BMD 测定的 8 个区域中,任一部位的 T 值 < −2.5 诊断为 OP,所有部位 T 值均 ≥ −1.0 为骨量正常,其余为骨量减少,分为骨量减低组(包括骨质疏松及骨量减少)和骨量正常组。骨量减低组 38 例,年龄(50.16 ± 6.86)岁,正常组 147 例,年龄(43.71 ± 7.19)岁。

1.2 研究方法

①所有受试者采集静脉血 3 mL,EDTA 抗凝,提取 DNA,PCR 反应扩增 CYP3A7 基因。参照文献[3],设计引物,正向引物 5′-CCATAGAGACAAGAGGAGA-3′,反向引物 5′-CTGAGTCTTTTTTTCAGCAGC-3′;25 μL 的反应体系中包括 200 ng 基因组 DNA,扩增包括起始变性温度 97℃、7 min;97℃ 1 min、56 ℃ 45 s、72 ℃ 1 min,35 个循环;再 72 ℃、7 min 延伸。酶切分析基因型,反应体积为 20 μL,包括 10 μL CYP3A7 基因 PCR 产物,10 × 的缓冲液 2 μL,1 μL (5 U)的限制性内切酶 Ssp-Ⅰ,7 μL 水。酶切条件为:37℃,消化 2 h。酶切产物用 4% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,凝胶成像系统分析。根据酶切结果对标本进行基因分型。② 骨密度检测:利用美国 Osteometer MediTech 公司的 DTX-200 测定受试者前臂的 BMD 值。由受过培训的专门技术人员具体操作以减少人为因素引起的误差(变异系数 < 1)。

1.3 统计学处理

所得结果采用 SPSS 13.0 软件进行分析。χ^2 检验分析 CYP3A7 等位基因频率是否符合 Hardy-Weinberg 定律;χ^2 检验比较不同骨密度组间基因型的差异;组间计量资料比较用单因素方差分析(ONE-ANOVA);用协方差(ANCOVA)分析经年龄、身高和体重调整后的 BMD 值与各基因型的关系。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,$P \leqslant 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CYP3A7 基因 PCR 扩增产物

CYP3A7 基因 PCR 扩增产物应为 370 bp,经琼脂糖凝胶电泳后得出目的条带(见图 1)。CYP3A7 基因经 Ssp-I 酶切后分别得到野生型 126 bp,244 bp 片段,突变杂合型 370 bp,126 bp,244 bp 3 个片段,突变纯合型 370 bp 片段。经琼脂糖凝胶电泳后得出 TT,TG,GG 3 种基因型(见图 2)。

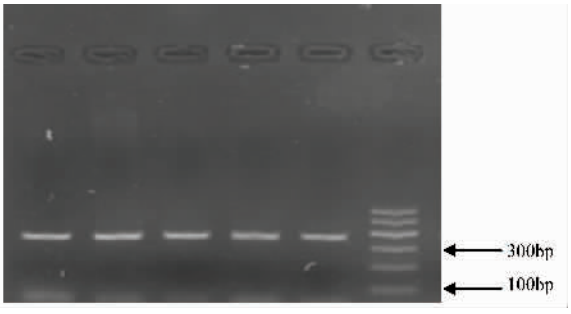

图 1 CYP3A7 基因 PCR 扩增产物
→所指为目的片段 370 bp。←为 600 bp 的 marker

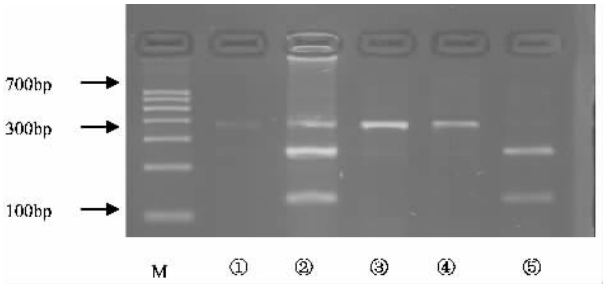

图 2 CYP3A7 基因经 Ssp-Ⅰ酶切后的产物
M 为 700 bp 的 marker;①为突变纯合型 GG,即 370 bp;②、③、④为突变杂合型 TG,即 370 bp、244 bp、126 bp;⑤野生型 TT,即 244 bp、126 bp

2.2 骨密度正常及骨密度降低组 CYP3A7 基因型及等位基因频率的分布(见表 2)

正常组与骨量减低组相比,CYP3A7 基因 TT 型基因型频率无明显增高,TG 型与 GG 型无明显降低($\chi^2 = 3.561$,$P = 0.059$);T 等位基因频率明显增高,G 等位基因频率明显减低($\chi^2 = 4.126$,$P = 0.046$)。

表 1 CYP3A7 基因型频率及等位基因频率(%)

组别	例数	基因型频率			等位基因频率	
		TT	TG	GG	T	G
正常组	147	124(84.4)	22(15.0)	1(0.7)	270(91.8)	24(8.2)
骨量减低组	38	27(71.1)	10(26.3)	1(2.6)	64(84.2)	12(15.8)

2.3 受试者的临床资料、骨密度及 CYP3A7 基因的关系(见表 2)

185 例受试者临床资料显示,骨量减低组(骨量减低/骨质疏松)与骨量正常组之间比较,其年龄、身高、体重、体指数、骨密度及 CYP3A7 * 1C 基因频率均有差异($P < 0.05$)。

表 2 受试者的临床资料、骨密度及 CYP3A7 基因($\bar{x} \pm s$,%)

项目	正常对照组 $n = 147$	骨量减低组 $n = 38$	总数 $n = 185$
年龄	43.71 ± 7.19	50.16 ± 6.86*	45.03 ± 7.57
身高(cm)	158.74 ± 4.83	156.25 ± 5.54*	158.22 ± 5.07
体重(kg)	63.21 ± 11.94	56.59 ± 9.38*	61.83 ± 11.75
体重指数(kg/m²)	35.47 ± 6.30	33.17 ± 6.85*	34.99 ± 6.47
骨密度(BMD)	0.51 ± 0.06	0.37 ± 0.06*	0.49 ± 0.08
前臂 T 值	0.41 ± 1.03	−2.04 ± 0.97*	−0.09 ± 1.42
前臂 Z 值	0.57 ± 1.03	−1.52 ± 0.92*	0.14 ± 1.32
CYP3A7*1C 基因频率	8.2	15.8	9.7

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$

2.4 不同骨密度组间 CYP3A7 基因型和等位基因分布频率比较(见表 3)

协方差分析显示,经年龄、身高、体重、BMI 调整后的所有 185 例受试者的 CYP3A7 基因型 TT、TG、GG 各组之间左前臂 BMD 值差异有显著性($P < 0.05$),CYP3A7 基因型与左前臂 BMD 值有相关性。

表 3 受试者 CYP3A7 基因型频率与其临床资料及骨密度($\bar{x} \pm s$,%)

项目	TT $n = 151$	TG $n = 32$	GG $n = 2$	P 值
年龄	44.92 ± 7.71	45.81 ± 7.00	41.00 ± 8.49	> 0.05
身高(cm)	158.67 ± 4.89	158.19 ± 5.61	157.00 ± 1.41	< 0.05
体重(kg)	62.36 ± 11.75	59.63 ± 11.58	57.50 ± 16.83	> 0.05
体重指数(kg/m²)	35.17 ± 6.46	34.19 ± 6.58	34.55 ± 8.27	> 0.05
骨密度(BMD)	0.49 ± 0.08	0.45 ± 0.09	0.45 ± 0.04	< 0.05[a]
前臂 T 值	0.06 ± 1.37	−0.75 ± 1.54	−0.70 ± 0.71	< 0.05[a]
前臂 Z 值	0.29 ± 1.23	−0.51 ± 1.54	−0.70 ± 0.71	< 0.05[a]

注:a 为调整后年龄、身高、体重后

3 讨论

CYP3A7 是人胎儿中较重要的细胞色素 P450(CYP450)酶,它在胎儿体内的表达水平较高,约占 CYP3A 家族的 87% ~ 100%[4]。出生后便显著降低,与胎儿相比,成人 CYP3A7 mRNA 表达率仅为 1.7%[5],然而,在 CYP3A7 变异体 CYP3A7 * 1C 中,酶表达水平较高[6]。目前研究发现,CYP3A7(CYP3A7 * 1C) mRNA 表达增加与其启动子中的 60bp 片断被替换有关,该片断与 CYP3A4 的启动子具有同源型(见图 3)。由于基因突变增加了孕 X 受体(PXR)即 PXRα 复合物与相关联的反应元件(ER-6)的相互作用,从而使转录增加[7-9]。

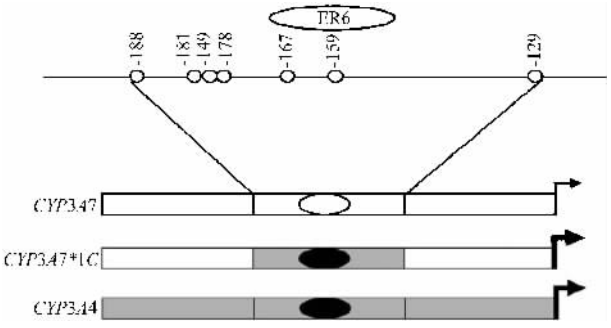

图 3 CYP3A7 * 1C 发挥作用可能机理(图片来源于 Burk, O 等文献[7])

CYP3A7 作为细胞色素 P4503A 家族的一员,参与多种内源性和外源性化合物代谢,尤其是参与胆固醇、类固醇和其他类脂质的合成[10, 11]。国外学者研究发现[3, 12] 在野生型 CYP3A7 和变异型 CYP3A7 * 1C 中,血清硫酸脱氢表雄酮水平存在较大差异,提示 CYP3A7 酶活性(对应 CYP3A7 变异基因型)的持续存在,导致血清硫酸脱氢表雄酮水平的降低。

骨质疏松是一种全身性代谢疾病,其发生发展与性激素有关。多篇文献报道 CYP3A7 启动区的基因多态性及 CYP3A7 * 1C 与 BMD 的相关性[6, 13]。本研究结果再次证实了上述理论,经年龄、身高、体重、BMI 调整后的所有患者的 CYP3A7 基因型 TT、TG、GG 各组之间左前臂 BMD 值差异有显著性($P < 0.05$),CYP3A7 基因型与左前臂 BMD 值有相关性。Bacsi 等[13] 报道骨密度降低组与对照组的等位基因发生频率分别为 3.9% 和 1.5%,而本研究中,两组患者等位基因的发生率分别为 15.8% 和 8.2%,差异具有统计学意义,但基因型无明显差异($P > 0.05$)。CYP3A7 具体如何影响 BMD,机理尚不明确,硫酸脱氢表雄酮可能参与其中发挥重要作用,需要后续研究加以证实。

CYP3A7 * 1C 等位基因突变在各种族人群中的发生率差异较大,在荷兰人、高加索人及英国人发生频率分别为 3.4%、1.5% ~ 4.2% 和 2.7%,而在美国黑人的发生率为 6%。我国尚没有大规模的探讨不同民族 CYP3A7 * 1C 等位基因突变的发生率,笔者

仅以我国内蒙古地区蒙古族绝经妇女为研究对象，等位基因突变的发生率为9.2%，远高于文献报道[3,6,12,13]。

总之，我们在初步探讨我国内蒙古地区蒙古族绝经妇女CYP3A7基因多态性的基础上，进一步明确了该基因多态性与BMD的关系，CYP3A7*1C可作为预测骨质疏松发生的危险性因素。此外，我们尚需进一步扩大样本数，深入研究此基因多态性在骨质疏松发生发展中的作用，期待为骨质疏松的治疗提供新的方向。

【参考文献】

[1] Bacsi K，Kosa JP，Borgulya G，et al. CYP3A7*1C polymorphism，serum dehydroepiandrosterone sulfate level，and bone mineral density in postmenopausal women. Calcif Tissue Int，2007，80(3)：154-159.

[2] Bacsi K，Kosa J，Lazary A，et al. Impact of CYP3A7*1C polymorphism on bone mineral content in postmenopausal women. Orvosi Hetil Orvosi Hetilap A CYP3A7*1C-Polimorfizmus Hatasa a Csont Asvanyanyag-Tartalmara Posztmenopauzas Nokben，2007，148(27)：1273-1280.

[3] Smit P，Van Schaik R，der Van Werf，et al. A common polymorphism in the CYP3A7 gene is associated with a nearly 50% reduction in serum dehydroepiandrosterone sulfate levels. J Clin Endocrinol Metab Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism，2005，90(9)：5313-5316.

[4] Stevens JC，Hines RN，Gu C，et al. Developmental expression of the major human hepatic CYP3A enzymes. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics，2003，307(2)：573-582.

[5] Greuet J，Pichard L，Bonfils C，et al. The fetal specific gene CYP3A7 is inducible by rifampicin in adult human hepatocytes in primary culture. Biochemical and Biophysical Research Communications，1996，225(2)：689-694.

[6] Kuehl Peter. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. Nature Genetics，2001，27(4)：383-391.

[7] Burk O，Tegude H，Koch I，et al. Molecular mechanisms of polymorphic CYP3A7 expression in adult human liver and intestine. J Biol Chem Journal of Biological Chemistry，2002，277(27)：24280-24288.

[8] 程春雷，游雪甫. 细胞色素P450 3A研究进展. 国外医药·抗生素分册，2004，25(3)：124-127.

[9] Burk O，Wojnowski L. Cytochrome P450 3A and their regulation. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology，2004，369(1)：105-124.

[10] Stevens JC. New perspectives on the impact of cytochrome P450 3A expression for pediatric pharmacology. Drug Discovery Today，2006，11(9-10)：440-445.

[11] Lee AJ，Conney AH，Zhu BT. Human cytochrome P450 3A7 has a distinct high catalytic activity for the 16(alpha)-hydroxylation of estrone but not 17(beta)-estradiol. Cancer Res Cancer Research，2003，63(19)：6532-6536.

[12] Goodarzi MO，Xu N，Azziz R. Association of CYP3A7*1C and serum dehydroepiandrosterone sulfate levels in women with polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab The Journal of clinical endocrinology and metabolism，2008，93(7)：2909-2912.

[13] Bacsi K，Kosa JP，Borgulya G，et al. CYP3A7*1C polymorphism，serum dehydroepiandrosterone sulfate level，and bone mineral density in postmenopausal women. Calcif Tissue Int Calcified tissue international，2007，80(3)：154-159.

（收稿日期：2008-11-06）