

CTR 基因多态性及中医证型与绝经后妇女骨质疏松骨密度的关系

赵云芳 陈荣庄 白董 王炳南

中图分类号: R589.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)02-0099-04

摘要:目的 观察降钙素受体(CTR)基因多态性及中医证型与绝经后妇女骨质疏松骨密度的关系。方法 选择 2006 年 7 月至 2008 年 2 月绝经后骨质疏松症患者 120 例,采用双能 X 线骨密度仪测定部位骨密度,中医辨证分型,记录患者年龄、绝经年龄、绝经年限、身高、体质量等自身因素,应用聚合酶链反应检测降钙素受体基因多态性。结果 CTR 基因型分布:CC 型 74.17%,CT 型 21.67%,TT 型 4.17%;中医证型分布:脾肾阳虚型 71.67%,肝肾阴虚型 22.50%,气滞血瘀型 7 例 5.83%。经 t 检验,不同 CTR 基因型者间骨密度差异无统计学意义,各中医证型者骨密度间差异无统计学意义。在 CC 型中,气滞血瘀的腰椎骨密度明显低于脾肾阳虚($P < 0.05$)。结论 降钙素受体基因多态性及中医证型与绝经后骨质疏松症骨密度存在相关性。

关键词: 中医证型; 绝经后骨质疏松; 骨密度; 降钙素受体基因多态性

Calcitonin receptor gene polymorphism and traditional Chinese medicine differentiation type in relation to bone mineral density in female patients with postmenopausal osteoporosis ZHAO Yunfang, CHEN Rongzhuang, BAI Dong, et al. First Department of Surgery, Changping Hospital of Dongguan, Dongguan 523563, China

Abstract: **Objective** To study the relationship between the Calcitonin receptor (CTR) gene polymorphism uniting traditional Chinese medicine (TCM) differentiation type and bone mineral density (BMD) in female postmenopausal osteoporosis (POP). **Methods** 120 patients with postmenopausal osteoporosis were investigated from July 2006 to February 2008. They all knew the fact and accepted. The BMD of the 2th-4th lumbar vertebrae, left upper femur, greater trochanter and Ward's area was measured with dual energy X-ray absorptiometry. Self-factor of patients were recorded. The CTR gene polymorphism was detected by polymerase chain reaction. Normal data were compared with t -test, no normal data were compared with Wilcoxon rank sum test, and relationship between self-factors and BMD were analyzed with Bivariate method. **Results** Totally 120 POP patients entered the final analysis. BMD of POP patients with 3 kinds CTR was not significantly different from that of patients with various TCM differentiation types, and differences among 3 kinds of TCM differentiation types were not significant; In CC genotype, BMD of the 2th-4th lumbar vertebrae in qi-stagnancy and blood stasis patients was significantly lower than that in asdthenic splenonephro-yang patients. **Conclusion** The polymorphism of CTR gene uniting TCM differentiation type is correlated with BMD in POP.

Key words: TCM differentiation type; Postmenopausal osteoporosis(POP); Bone mineral density(BMD); Calcitonin receptor(CTR) gene polymorphism

骨质疏松的研究已经进入分子生物学水平,研究表明骨质疏松发生与遗传基因有很大的关系,而

中医诊断的核心是辨证分型,这两者是否有一定的关联性,即基因辨证是否成为可能从遗传基因多态性分析中医辨证类型,笔者希望从基因层面上找到中西医的结合点,从而丰富祖国医学的辨证内容和方法。

到目前为止,应用中医证型联合降钙素受体(Calcitonin receptor,CTR)基因多态性来研究绝经后

作者单位: 523563 东莞 东莞市常平医院外一科(赵云芳);广州中医药大学(陈荣庄、白董);广州中医药大学附属骨伤科医院(王炳南)

通讯作者: 赵云芳, Email: zyfrhh@126.com

骨质疏松症尚未见报道。为此 ,笔者采用聚合酶链反应限制性片段长度多态性技术检测绝经后骨质疏松症患者的降钙素受体基因多态性 ,并对患者进行中医分型 ,分析中医证型及降钙素受体基因多态性与骨密度的相关性 ,为筛选 OP 相对高危人群提供理论依据 ,以期及早给予有效的防治。

1 材料和方法

1.1 对象

于 2006 年 07 月至 2008 年 02 月 ,收集广州中医药大学附属骨伤科医院骨科住院及门诊绝经后骨质疏松患者 120 例 ,年龄(64.8 ± 5)岁 ,绝经年龄(48 ± 4)岁。均对检测项目知情同意。纳入标准 :①通过骨密度检查 ,符合骨质疏松诊断标准 ;参照《中国人骨质疏松症建议诊断标准》(第二稿) ;②绝经 5 年以上的妇女 ;③年龄在 60 ~ 70 岁之间。患者上三代都应生活在广州。

排除标准 :①不符合骨质疏松症诊断标准 ;②有引起继发性骨质疏松症的各种内分泌疾病者 ;③其他严重疾病干扰骨代谢者 ;④卵巢摘除者 ;⑤半年内曾使用过激素、降钙素或其他影响骨代谢的药物者 ;⑥患有严重心脑血管疾病或肝肾功能衰竭患者 ;⑦其他能引起继发性骨质疏松的疾病和因素。

1.2 方法

1.2.1 中医证候辨证 :由经广州中医药大学重点学科骨质疏松学科组教授专门培训的人员按中医证候辨证标准研究对象进行辨证。中医证候辨证标

准 :参考公认的《中医虚证辨证参考标准》和《血瘀证诊断标准》以及刘庆思主编《实用骨质疏松症防治指南》作为临床绝经后骨质疏松中医辨证分型标准。分为肝肾阴虚证、脾肾阳虚证及气滞血瘀证等证型 ,临床中有兼杂证者 ,皆以主证为辨证分型标准。

1.2.2 CTR 基因多态性 :抽取外周全血 2 mL ,经 EDTA 抗凝 ,4℃ 保存备用。参照文献 [1]试剂盒提取基因组 DNA :PCR 扩增引物^[2]序列为 :P1 :5'-CTCAGTGATCAGGATACTGTG-3' ;P2 :5'-TTCAGTGGACCAGCGTTGG-3'。反应体系 50 μL ,反应体系包含以下组成成分 :50 mmol/L KCl ,10 mmol/L Tris-Cl(pH 8.3) ,0.01% 明胶 ,1.5 mmol/L MgCl₂ ,200 μmol/L dNTP ,Taq 酶 2 U ,基因组 DNA 200 ng ,上下游引物各 0.25 μpmol/L。反应条件 :95℃ 5 min 预变性 ,随后进行三温循环 :95℃ 30 s ,57℃ 30 s ,72℃ 30 s。40 个循环结束后 ,72℃再延伸 5 min。扩增产物检查 :扩增完毕后 ,取 10 μL 扩增产物 ,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 ,溴化乙锭染色 ,紫外灯下观察 ,以确定扩增是否成功 ,以 100 bp DNA ladder 为相对分子质量标准。基因分型取扩增产物 20 μL ,加入 AluI 内切酶 3 U ,37℃ 恒温水浴。16 h 后 ,取 10 μL 酶切产物 ,经 2.5% 琼脂糖凝胶电泳 ,溴化乙锭染色 ,在凝胶成像分析系统拍照分型。CTR 基因型确定 :出现 120 bp 和 108 bp 的记为 TT 型 ,仅出现 228 bp 的记为 CC 型 ,出现 228 bp、120 bp 和 108 bp 3 条带的记为 CT 型(图 1)。

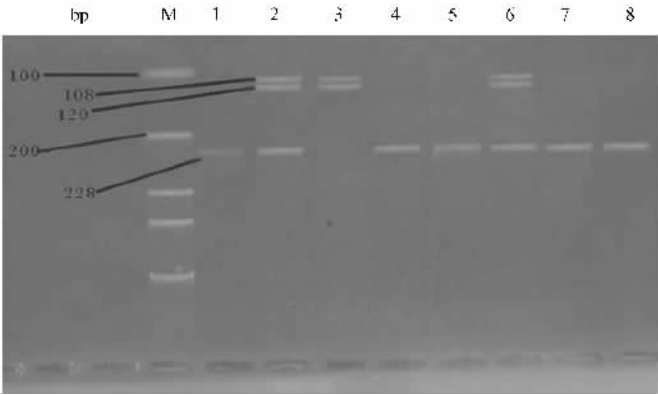


图 1 CTR 基因 PCR 产物酶切电泳图

M :DL100 Marker ;1、4、5、7、8 :CC 基因型 ;3 :TT 基因型 ;2、6 :CT 基因型

1.2.3 骨密度(BMD)检测 :采用双能 X 线骨密度仪(美国 Hologic 公司生产 QDR-4000 型 ,变异系数 CV < 0.1%) ,测量第 2 ~ 4 腰椎侧位、左侧股骨颈、大转子及 Ward's 区骨密度。

1.2.4 一般情况调查 :登记患者的性别、年龄、绝经年限、身高与体质量等 ,并计算体重指数(body mass index ,BMI) ,BMI = 体重(kg)/身高(m²)。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件包运用相关统计方法进行统计学分析。计量资料两组比较正态分布用 t 检验 ,非正态分布用 Wilcoxon 秩和检验。

2 结果

2.1 中医证型和 CTR 基因型分布(表 1)

由表 1 可见 ,该人群中 CC 型占 74.17% ,CT 型占 21.67% ,TT 型占 4.17% ,基因频率符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡规律。中医证型 :脾肾阳虚型 71.67% ,肝肾阴虚型 22.50% ,气滞血瘀型 5.83%。

表 1 中医证型与 CTR 基因型分布

证型	<i>n</i>	CC 型	CT 型	TT 型
肝肾阴虚	27	22	3	2
脾肾阳虚	86	64	20	2
气滞血瘀	7	3	3	1
合计	120	89	26	5

注 经多组秩和检验(Kruskal-Wallis 法) ,差异无统计学意义

2.2 CTR 基因型与骨密度的关系(表 2)

由表 2 可见 ,研究对象 4 个部位的骨密度各基因型间差异均无统计学意义($P>0.05$)。

表 2 不同 CTR 基因型者骨密度比较($\bar{x} \pm s$,g/cm²)

基因型	<i>n</i>	第 2~4 腰椎	股骨颈	大粗隆	Ward's 区
CC 型	89	0.742±0.083	0.682±0.084	0.567±0.096	0.491±0.126
TT 型	5	0.752±0.058	0.647±0.033	0.619±0.116	0.504±0.061
CT 型	26	0.741±0.062	0.679±0.064	0.592±0.075	0.485±0.078

2.3 不同中医证型者骨密度比较(表 3)

3 种中医证型骨质疏松症患者骨密度 t 检验比较 ,差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 3 不同中医证型者骨密度比较($\bar{x} \pm s$,g/cm²)

证型	<i>n</i>	第 2~4 腰椎	股骨颈	大粗隆	Ward's 区
肝肾阴虚	27	0.723±0.083	0.692±0.084	0.572±0.094	0.495±0.132
脾肾阳虚	86	0.745±0.089	0.687±0.079	0.577±0.092	0.489±0.117
气滞血瘀	7	0.713±0.090	0.651±0.068	0.564±0.097	0.457±0.128

2.4 CC 型不同中医证型者骨密度比较(表 4)

在 CC 型中 ,肝肾阴虚、脾肾阳虚和气滞血瘀 3 组的骨密度 t 检验比较 :气滞血瘀的腰椎骨密度明显低于脾肾阳虚($P<0.05$) ,其他组间比较 ,差异不

明显($P>0.05$)。

表 4 CC 型不同中医证型者骨密度比较($\bar{x} \pm s$,g/cm²)

证型	<i>n</i>	第 2~4 腰椎	股骨颈	大粗隆	Ward's 区
肝肾阴虚	22	0.723±0.086	0.687±0.096	0.573±0.098	0.495±0.137
脾肾阳虚	64	0.739±0.098	0.689±0.077	0.576±0.093	0.485±0.131
气滞血瘀	3	0.691±0.089	0.653±0.076	0.525±0.087	0.467±0.136

2.5 CC 型与 CT 型脾肾阳虚者骨密度比较(表 5)

脾肾阳虚者 CC 型与 CT 型骨密度经 t 检验比较 ,差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 5 CC 型与 CT 型脾肾阳虚者骨密度比较($\bar{x} \pm s$,g/cm²)

基因型	<i>n</i>	第 2~4 腰椎	股骨颈	大粗隆	Ward's 区
CC 型	64	0.746±0.096	0.685±0.082	0.569±0.098	0.492±0.123
CT 型	20	0.724±0.074	0.689±0.078	0.592±0.082	0.495±0.065

3 讨论

本课题对广州地区 120 名汉族绝经后妇女 CTR 基因多态性研究显示 ,基因型分布 :CC 型占 74.17% ,CT 型占 21.67% ,TT 型占 4.17% ,该位点等位基因频率分布符合 Hardy-Weinberg 定律 ,并且与北京章振林等^[3]、上海赵红燕等^[4]、广州李东风等^[5]的研究结果相一致 ,Nakamura 等^[6]对 152 名健康日本妇女调查表明 ,CC 型最多为 77% ,CT 型和 TT 型分别是 20.4% 和 2.6%。Tsai 等^[7]对 167 名绝经后台湾妇女 CRGP 检测表明 ,CC 型为 75.4% ,CT 型和 TT 型分别是 22.2% 和 2.4%。其中 TT 型有相对高的风险发展为腰椎和股骨颈的骨质疏松 ,但这种不利基因只是少数。Zhang 等^[8]对中国汉族妇女的调查表明 ,CC 型最多为 91% ,TC 型和 TT 型分别是 8.1% 和 0.9%。最近 Wolfe 等^[9]对美国高加索人、美国黑人、亚洲人(包括日本和中国)和西班牙裔美国人的 DNA 样分析结果表明 ,CTR 的基因型分布与上述结果类似。结合文献可见我们的研究与日本 Nakamura 等^[6]的研究结果也相似 ,绝大多数个体为 CC 基因型 ,TT 型比例最低。但与高加索人明显不同^[10,11] ,高加索妇女人群中 CC 基因型最少 ,说明 CTR 基因多态性频率分布存在种族特异性。

降钙素是已知的调节骨代谢的三大重要激素之一 ,降钙素受体基因已成为当今较瞩目的研究方向 ,对降钙素受体基因多态性与骨密度关系的研究在国

际上开始引起重视。目前 ,有关降钙素受体基因多态性与骨质疏松相关性的研究报道较多 ,但研究结果多不一致。本研究分析了降钙素受体基因多态性与女性绝经后骨质疏松症骨密度的关系 ,结果提示这种相关性不显著($P > 0.05$)。本次研究的结果与报道的高加索人种不同 ,与王琦等^[12]所报道的中国藏族女性人群也不相同。他们认为 :TC 基因型相对 CC 基因型者易得到更高的峰值骨量 ,CTR 基因型对于骨量的影响主要是影响峰值骨量的获得 ,而与骨量的丢失率无关。CC 基因型则是引起藏族女性骨质疏松发生的危险因素。赵红燕等^[4]对上海女性的 CTR 检测发现 ,对于绝经前妇女而言 ,CTR 基因多态性与骨密度之间无相关性 ,绝经后妇女 CC 基因型个体的股骨颈 BMD 明显高于其他两种基因型。广州妇女与高加索妇女、中国藏族妇女及上海妇女在 CTR 与骨密度相互关系的结论不一致 ,说明 CTR 基因多态性的分布、基因的表达及对骨密度的作用受种族及地理因素的影响 ,也表明种族和环境是影响骨密度一个不可忽视的因素。

针对降钙素受体基因多态性与骨质疏松关系的不确定性 ,本研究将中医辨证与降钙素受体基因多态性联合起来 ,在 CC 型中 ,肝肾阴虚、脾肾阳虚和气滞血瘀 3 组的骨密度 t 检验比较 :气滞血瘀的腰椎骨密度明显低于脾肾阳虚($P < 0.05$) ,研究发现 CTR 基因多态性及中医证型分类与绝经后骨质疏松症骨密度存在相关性。本研究认为降钙素受体基因多态性联合中医证型有助于临床筛选影响不同类型人群骨密度的因素。

【 参 考 文 献 】

[1] Albarino CG ,Romardwski V. Phenol extraction revisited :a rapid

methods for the isolation and preservation of human genomie DNA from whole blood. Mol Cell Probe ,1994 ,8 :423-427.

[2] Nakamura M ,Zhiang Z ,Liang S ,et al. Allelie variants of human receptor in the Japanese population. Hum Genet ,1997 ,99(1) :38-41.

[3] 章振林 ,孟迅吾 ,周学瀛 ,等.北京地区汉族妇女维生素 D 受体基因和降钙素受体基因多态性与骨密度的关系.中华内分泌代谢杂志 ,2002 ,18(2) 90-94.

[4] 赵红燕 ,刘健民 ,宁光 ,等.降钙素受体基因多态性与上海地区妇女骨密度的关系.中国医学科学院学报 ,2003 ,25(3) :258-261.

[5] 李东风 ,吴文 ,蔡雪珍 ,等.降钙素受体基因多态性与广州地区绝经后妇女骨密度关系研究.华南预防医学 ,2005 ,31(6) :14.

[6] Nakamura M ,Morimoto S ,Zhang Z ,et al. Calcitortin receptor gene polymorphism in japanese women :correlation with body mass and bone mineral density. J Calcif Tissue Int ,2001 ,68(4) 211-215.

[7] Tsai FJ ,Chen WC ,Chen HY ,et al. Gynecol Obstet Invest ,2003 ,55 (2) 82-87.

[8] Zhang ZL ,Meng XW ,Zhou XY ,et al. Chin Med J ,2001 ,114(10) :122-129.

[9] Wolfe ,Fling ME ,Zheng YX ,et al. Mutation Res ,2003 ,522 :93-105.

[10] Masi L ,Becherini L ,Gennari L ,et al. Allelie variants of human calcitonin receptor :distribution and association with bone mass in postmenopausal Italian women. Biochem Biophys Res Commun ,1998 ,245(2) 622-626.

[11] Taboulet J ,Frenkian M ,Frendo JL ,et al. Calcitonin receptor polymorphism is associated with a decreased fracture risk in postmenopausalwomen. Hum Mol Genet ,1998 ,7(13) 2129-2133.

[12] 王琦 ,葛宝丰 ,殷莹 ,等.藏族妇女降钙素基因多态性和骨质疏松的相关性.中国临床康复 ,2004 ,8(27) 5901-5903.

(收稿日期 :2008-10-21)