

# 甲状旁腺素基因多态与 2 型糖尿病患者骨密度的关系

程洁 姜宏卫 柳林 翟木绪 董砚虎

中图分类号: R587.1 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)04-0255-04

**摘要:**目的 探讨甲状旁腺素(PTH)基因多态与中国北方汉族人 2 型糖尿病患者骨密度的关系。方法 运用聚合酶链反应限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术检测了 2 型糖尿病(T2DM)组 104 例,健康对照(CON)组 102 例,206 例中国北方汉族人 PTH 基因多态性;采用双能 X 线吸收法骨密度仪(DEXA)测量骨密度(BMD)。结果 甲状旁腺素(BSTB1 位点)基因型和等位基因分布频率在 2 型糖尿病组与对照组间差异无显著性( $P > 0.05$ );在对照组及 2 型糖尿病组,Bb/bb 基因型者 L<sub>2-4</sub>和 Neck 部位 BMD 显著低于 BB 型( $P < 0.05$ ),Troch 及 Ward's 三角区 BMD 差异无显著性( $P > 0.05$ )。结论 2 型糖尿病患者 PTH 基因多态性(BST B1 位点)可能是预测骨量减少、骨质疏松易感性的遗传标志。

**关键词:** 甲状旁腺素; 基因多态; 骨密度; 2 型糖尿病

**Association of parathyroid hormone gene polymorphism with bone mineral density in the subjects with type 2 diabetes mellitus** CHENG Jie, JIANG Hongwei, LIU Lin, ZHAI Muxu, DONG Yanhu. Department of Nephropathy, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001, China

**Abstract:** **Objective** To evaluate the effect of parathyroid hormone gene polymorphism on bone mineral density (BMD) of type 2 diabetic patients of indigenous Han of north Chinese. **Methods** The 206 cases with 104 with type 2 diabetes mellitus (T2DM group) and 102 healthy controls (CON group). Polymorphism of parathyroid hormone gene was determined by PCR-RFLP method. Bone mineral density (BMD) was measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA). **Results** There was no significant difference in the distribution of genotypes and allele frequencies of PTH between the type 2 diabetic and control group ( $P > 0.05$ ). Subjects with "BB" genotype had higher BMD at lumbar spine and femoral neck than those with "Bb/bb" genotype in control and type 2 diabetic group ( $P < 0.05$ ), respectively. **Conclusion** In type 2 diabetic subjects, BST B1 polymorphism of PTH gene would be a useful genetic marker for lower BMD and the susceptibility to osteoporosis.

**Key words:** Parathyroid hormone; Gene polymorphism; Bone mineral density; Type 2 diabetes mellitus

骨质疏松症(OP)是最常见的代谢性骨病,据 2005 年世界糖尿病联盟统计,目前全世界约有 2 亿人患 OP。据 2000 年第 5 次全国人口普查统计,我国 OP 患者约 8800 万。流行病学调查显示,糖尿病(DM)患者糖尿病性骨质疏松的发病率和 OP 性骨折的危险性明显高于普通人群,其中 1 型 DM 患者骨量减少和骨质疏松发病率为 48%~72%,女性患者的骨折发病率是非 DM 妇女的 12.25 倍<sup>[1]</sup>。2 型糖尿

病(T2DM)患者骨质疏松发病率 20%~60%,其中老年女性比非 DM 女性骨质丢失快,骨折发病率明显增加<sup>[2]</sup>。遗传因素在 OP 的病理生理机制中发挥关键作用<sup>[3]</sup>。本研究通过测定 T2DM 患者甲状旁腺素(PTH)的基因型及骨密度(BMD),以期了解 T2DM 患者 PTH 基因型的分布频率,揭示 PTH 基因多态与 T2DM 性骨量减少及骨质疏松关系,为筛选 T2DM 性骨质疏松相对高危人群提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象

1.1.1 2 型糖尿病组(T2DM) 随机选择在青岛市内分泌糖尿病医院住院 T2DM 患者 104 例,年龄在 20

作者单位: 524001 湛江,广东医学院附属医院肾病内科(程洁);青岛市内分泌糖尿病医院暨研究所(姜宏卫、柳林、翟木绪、董砚虎)

通讯作者: 董砚虎, Email: Dongyh@public.qd.sd.cn

岁~65岁之间,均为北方汉族人,相互之间无亲缘关系。糖尿病诊断标准参照 WHO 标准(1999年标准)。所有受检者均无肝、肾慢性疾患,无长期服用影响骨代谢的药物史,除糖尿病外,无其他内分泌代谢性骨病及可能影响骨密度的疾病,受检者均接受腰椎侧位 X 光片检查,证实腰椎结构适于 BMD 测量。所有研究对象均知情同意。

1.1.2 对照组(CON)102例,年龄24~63岁,为健康体检者和志愿者。所有研究对象均知情同意。

1.2 实验方法

1.2.1 临床及生化指标:所有研究对象均测血Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、P、HbA1c,放免法测定血清骨钙素(BPG)、降钙素(CT)和25羟维生素D<sub>3</sub>[25(OH)D<sub>3</sub>],免疫放射分析法测定血清完整甲状旁腺素(PTH)及I型胶原羧基末端前肽(CICP),采用双能X线吸收法骨密度仪(DEXA)测量BMD,计算体重指数(BMI)。

1.2.2 PTH 基因型检测:采用标准的酚-氯仿-蛋白酶K法提取外周血DNA。上游引物5'-CATTCTGTGTACTATAGTTG-3'及下游引物5'-GAGCTTTGATTAGCA-3'。反应条件:94℃变性1min,55℃退火1min,72℃延伸1min,最后于72℃延伸7min,35个循环。PCR产物用限制性内切酶BSTB1酶切,产物经3%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,凝胶图像分析系统下分析基因型。

1.2.3 统计学处理:由于Bb基因型及bb基因型其临床变量数值接近,故将两组进行合并统计分析,用基因计数法计算各组基因型频率及等位基因频率。应用SPSS 10.0统计软件进行数据处理,分类变量采用χ<sup>2</sup>检验,组间比较用方差分析及协方差,两两比较用Student's t检验,遗传平衡吻合度检验用Hardy-Weinberg平衡法。

2 结果

2.1 CON组和T2DM组临床及生化特征比较

两组间年龄、性别相匹配,两组间血清PTH、CT及CICP差异无显著性,T2DM患者BGP均显著低于CON组(P<0.05),T2DM组BMI明显高于CON组(P<0.05),T2DM组各部位BMD与CON组差异无显著性(P>0.05)。

2.2 PTH 基因型判定(图1)

PCR反应产物经BSTB1酶切后,经琼脂糖凝胶电泳,根据酶切结果和DNA片段长度判断基因型:BB型(387,213bp)表示存在相应酶切位点的基因

型,缺乏相应酶切位点为bb型(600bp),Bb型(600bp,387bp,213bp)为杂合子。

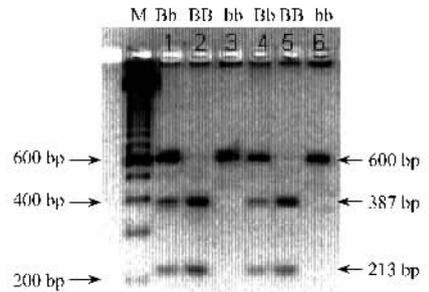


图1 BSTB1限制性内切酶酶切电泳结果

2.3 CON组和T2DM组PTH基因型分布频率(表1)

两组各等位基因频率符合Hardy-Weinberg遗传平衡(P>0.05)。携带B和b的基因型频率在两组间差异无统计学意义(P>0.05);B和b等位基因频率在两组间差异无统计学意义(P>0.05)。

表1 CON组和T2DM组PTH基因多态分布例数(%)

Table with 6 columns: 组别, 例数, 基因型 (BB, Bb, bb), 等位基因 (B, b). Rows for CON and T2DM groups.

2.4 T2DM组PTH不同基因型间临床和生化特征比较

104例T2DM患者根据PTH基因型(BSTB1位点)分为BB基因型、Bb/bb基因型两组。两组间年龄、病程、BMI差异无统计学意义(P>0.05),血HbA1c、PTH、CT、25(OH)D<sub>3</sub>及血Ca、P水平差异无统计学意义(P>0.05),但Bb/bb型者BGP、CICP明显高于BB型(P<0.05)。

2.5 CON组和T2DM组不同PTH基因型间的比较(表2)

表2 CON组和T2DM组不同PTH基因型间比较BMD(g/cm²)(x̄ ± s)

Table with 5 columns: 组别, 腰椎 L2-4, 股骨颈 Neck, 大转子 Troch, Ward's区 Ward's. Rows for CON and T2DM groups.

注:校正BMI之后,\*P<0.05

CON组和T2DM组BB基因型者 $L_{2-4}$ 和Neck部位BMD高于Bb/bb型( $P < 0.05$ );Troch及Ward's三角区BMD值差异无显著性( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

T2DM晚期存在胰岛素分泌绝对或相对不足。成骨细胞(OB)表面存在胰岛素受体,胰岛素能直接刺激OB,促进其细胞内氨基酸蓄积、骨胶原合成、分泌骨基质。胰岛素不足导致直接刺激作用减弱,OB减少、活性降低。胰岛素缺乏时,抑制OB合成骨钙素,使骨的更新率下降,骨形成减少;胰岛素可兴奋 $25\alpha$ 羟化酶,协同PTH调节 $\alpha$ 羟化酶活性,胰岛素缺乏时其活性降低,影响肠对钙的吸收,导致骨量降低<sup>[4]</sup>。Huafei等<sup>[5]</sup>对去除骨髓的DM小鼠研究发现,其骨基质较对照组明显减少,从基因水平检测发现核心转录因子Cbfal明显减少,推测DM患者可能通过抑制调节成骨细胞(OB)分化和形成的Cbfal而引起骨基质减少。本研究结果显示,T2DM患者BGP均显著低于CON组,而CICP与CON组差异无显著性,提示T2DM患者的骨形成、骨转化是降低的,支持T2DM性骨病不仅有BMD的改变,还包括骨质量的改变。二者可能通过共同作用而导致T2DM患者骨强度下降,骨折风险增加。另外,视网膜病变、神经病变的出现导致跌倒风险增加,也可能是DM患者骨折发生率增加的危险因素<sup>[6]</sup>。

目前T2DM性骨质疏松症的发病机制尚未阐明,除了与环境、代谢因素有关,遗传因素也可能参与了T2DM性骨质疏松的发生和发展。PTH基因位于11p15.1~15.3,其第2内含子具有限制性内切酶BstB1酶切位点。国外有研究表明PTH基因多态(BST B1)是低骨量及骨质疏松易感性的重要遗传标志,但结论不一。Hosoi T等<sup>[7]</sup>对日本绝经后妇女研究发现,BB、Bb和bb基因型分布频率分别为62.5%、16.7%和0.8%,Bb基因型腰椎BMD在纠正年龄、体重后的Z值比BB基因型明显降低,血清(骨钙素N端片段,完整骨钙素)及尿中骨代谢指标(尿脱氧吡啶啉)示Bb基因型有相对高的骨转换率,但血清完整PTH(iPTH)在两种基因型中无差异。对高加索妇女研究发现<sup>[8]</sup>,BB、Bb、bb基因型分布频率分别为15.4%、45%、39.6%,经过20年的随访研究发现,bb基因型桡骨皮质丢失率比BB、Bb基因型显著减少,但桡骨和股骨皮质面积在各基因型中无差异。在原发性甲旁亢(PHPT)患者中<sup>[9]</sup>,BB、Bb、bb基因型在PHPT患者和健康对照中无差异,在对照

组中BB基因型腰椎BMD比Bb、bb基因型显著高,而在PHPT患者中,各基因型间BMD无差异,但BB基因型血清钙水平比Bb、bb基因型显著高;PTH基因中亦存在DraII酶切位点(D表示存在酶切位点,b表示缺乏酶切位点),BMD在DD、Dd、dd基因型间无差异,DD基因型比Dd、dd基因型血清iPTH水平显著高;BBDD单倍型中血清碱性磷酸酶和iPTH高,提示PTH BstB1基因多态性与BMD密切相关,似乎不影响PHPT的发展过程,但与PHPT的病情有关。美国Gong等<sup>[8]</sup>早期研究显示,PTH基因型与BMD、BMC不相关,但后来研究表明PTH基因多态性与掌骨直径、皮质骨截面面积、皮质骨面积的年变化率相关。认为PTH基因多态性与骨体积、骨空间结构的相关性比面积密度(如BMD)更密切,可解释骨空间结构变量总变异的7%~9%。但Zhong等<sup>[10]</sup>对314名正常志愿者女性研究发现,BB、Bb、bb基因型频率分别为75.8%、23.3%、0.9%,B和b等位基因频率分别为87.5%、12.5%,PTH基因频率在绝经前和绝经后妇女中的分布差异无显著性。PTH基因多态与正常女性的骨密度和血清骨生化指标亦无相关性。李梅等<sup>[11]</sup>对270名北京地区汉族人群研究发现,PTH基因BB、Bb、bb型的频率分别为73.7%、25.9%、0.4%。等位基因B、b频率分别为86.7%及13.3%。绝经后妇女BB、Bb、bb型的频率分别为67.1%、32.2%、0.7%。等位基因B、b频率分别为83.2%及16.8%。在调整了年龄、身高、体重及体重指数等影响因素后显示,北京地区年轻及绝经后妇女组,BB与Bb型组间 $L_{2-4}$ 、Neck、Wards及Troch区BMD差异均无显著性,偏相关系数分析表明PTH基因型与各部位BMD无明显相关性。

PTH基因多态性对骨密度作用的具体机制尚未阐明,有研究显示,PTH基因的一些突变可导致特发性甲状旁腺机能减退症,如在常染色体隐性遗传的甲状旁腺机能减退症患者中,PTH基因内含子2的第一个核苷酸突变导致外显子跳跃<sup>[12]</sup>,PTH基因的信号肽编码区突变可通过破坏信号肽的疏水核团导致家族性甲状旁腺机能减退症<sup>[13]</sup>。有学者提出,PTH基因多态性可能通过改变PTH基因表达而影响PTH分泌、降解和/或PTH作用,从而影响骨密度及骨转换,如在原发性甲状旁腺机能亢进患者中,对应于PTH基因外显子的DraII位点与血清完整PTH水平显著相关<sup>[9]</sup>。另一种假设认为<sup>[14]</sup>,在PTH基因附近可能存在另一种未知骨质疏松基因。此基因可通过与PTH基因多态性相关联而影响骨代谢的一

系列过程。在本研究未发现基因型间(BST B1 位点)血清 PTH 水平差异有显著性,其机制有待于进一步探讨。但本研究显示,Bb 基因型组反映骨形成、骨吸收的骨代谢指标均升高,提示 PTH 基因多态性(BST B1 位点)可能通过改变骨转换而影响 BMD。

本研究显示,中国北方汉族人 PTH 基因型频率分布依次为 BB、Bb、bb 型,分别占 80.4%、18.6% 及 1.0%,其等位基因频率分布符合 Hardy-Weinberg 定律。等位基因 B、b 频率为 89.7% 和 10.3%,与美国高加索妇女<sup>[8]</sup>(B 为 38.5%,b 为 61.5%)明显不同,与日本<sup>[7,9]</sup>研究结果相似。本研究中 CON 组 Bb/bb 基因型组腰椎和股骨颈 BMD 低于 BB 型,与 Gong 等<sup>[8]</sup>研究结果不同,与 Hosoi 等<sup>[7]</sup>研究结果相似,考虑可能与种族遗传背景、地域差异以及环境等因素有关。本研究发现在 T2DM 人群中,PTH 基因多态与骨密度、骨量减少相关。T2DM 患者 Bb/bb 基因型腰椎和股骨颈 BMD 显著降低,提示 PTH 基因可能是 T2DM 患者骨量减少的易感基因,T2DM 患者 b 等位基因与并发骨量减少/骨质疏松的危险性增高相关。

应该注意的是,骨量主要受遗传因素的影响,但非遗传因素及其与遗传因素的相互作用共同决定骨量。PTH 基因多态性与 BMD 的相关性并不一定意味着 PTH 位点突变本身可引起 BMD 的变异,BST B1 位点多态性只能作为 PTH 基因区域的一个标志,而且这种相关性还受许多混杂因素影响,如环境因素中饮食习惯、生活方式等也可能会影响结果。

### 【参 考 文 献】

- [ 1 ] Liu EY, Wactawski WJ, Donabue RP, et al. Does low bonemineral density start in postteenage years in women with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2003 26(8): 2365-2369.
- [ 2 ] Schwartz AV, Sellmeyer DE, Strotmeyer ES, et al. Diabetes and bone

loss at the hip in older black and white adults. *J Bone Miner Res*, 2005 20(4): 596-603.

- [ 3 ] Kelly PJ, Morrisos NA, Sambrook PN, et al. Genetic influences on bone turnover, bone density and fracture. *Eur J Endocrinol*, 1995, 133: 265-271.
- [ 4 ] 黄国良, 张莹. 糖尿病性骨质疏松的评价与对策. *实用糖尿病杂志* 2006 2(4): 4-6.
- [ 5 ] Huafei L, Douglas K, Louis C, et al. Graves diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblasts differentiation. *Endocrinology*, 2003, 144(1): 346-452.
- [ 6 ] Schwartz AV, Sellmeyer DE, Ensrud KE, et al. Older women with diabetes have an increased risk of fracture: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 86(1): 32-38.
- [ 7 ] Hosoi T, Miyao M, Inoue S, et al. Association study of parathyroid hormone gene polymorphism and bone mineral density in Japanese postmenopausal women. *Calcif Tissue Int*, 1999 64: 205-208.
- [ 8 ] Gong G, Johnson L, Barger-Lux MJ, et al. Association of bone dimensions with a parathyroid hormone gene polymorphism in women. *Osteoporos Int*, 1999 9: 307-311.
- [ 9 ] Kanzawa M, Sugimoto T, Kobayashi T, et al. Parathyroid hormone gene polymorphisms in primary hyperparathyroidism. *Clinical Endocrinology*, 1999 50: 583-588.
- [ 10 ] Zhong N, Zhang H, Wu XP, et al. Relationship between polymorphism of parathyroid hormone and bone mineral density and relevant biochemical indicators in women. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2006, 86(6): 376-379.
- [ 11 ] 李梅, 孟迅吾, 周学瀛, 等. 北京地区汉族成人甲状旁腺素基因多态性与骨矿盐密度的相关性. *中国医学科学院学报*, 2001 23(23): 45-48.
- [ 12 ] Parkinson DB, Thakker RV. A donor splice site mutation in the Parathyroid hormone gene is associated with autosomal recessive hypoparathyroidism. *Nat Genet*, 1992, 1: 149-152.
- [ 13 ] Arnold A, Horst SA, Gardella TJ, et al. Mutation of the signal peptide-encoding region of the preproparathyroid hormone gene in familial isolated hypoparathyroidism. *J Clin Invest*, 1990 86: 1084-1086.
- [ 14 ] Partridge NC, Bloch SR, Pearman AT. Signal transduction pathways mediating parathyroid hormone regulation of osteoblastic gene expression. *J Cell Biochem*, 1994 55: 321-327.

(收稿日期: 2009-01-05)