

LEPR 基因 Gln223Arg 多态性与绝经后妇女骨质疏松症的相关性

厉锋 徐兆万 王炳武 刘伟强 庄青山

中图分类号: R363 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)06-0400-03

摘要:目的 探讨瘦素受体基因多态性与绝经后妇女骨密度(BMD)及骨质疏松症发生的关系。方法 研究对象随机选择自 2006 年 1 月~2008 年 1 月到骨科门诊就诊的绝经后妇女骨质疏松症患者,共 200 例,选择 200 例未发生骨质疏松症的老年绝经后女性作为对照组。测量各组成员股骨颈及腰椎骨的骨密度,并抽取外周血提取 DNA 并用 PCR-RFLP 方法检测各组成员的瘦素受体基因 Gln223Arg 基因型。结果 绝经后妇女骨质疏松组与正常绝经后妇女对照组的 Gln223Arg 基因型频率分布有显著差异,绝经后妇女骨质疏松症患者中 LEPR 基因 Gln223Arg 各基因型之间腰椎骨的骨密度值有明显差异($P < 0.05$),而各基因型之间股骨颈的骨密度值无明显差异($P > 0.05$)。结论 LEPR 基因 Gln223Arg 多态性与绝经后妇女骨质疏松症的发生及腰椎骨的骨密度值密切相关,与股骨颈的骨密度值无明显相关。

关键词:瘦素受体基因;骨质疏松症;多态性;骨密度值

doi: 10.3969/j.issn.1006-7108.2009.06.002

Association between Gln223Arg polymorphism in leptin receptor gene and osteoporosis in postmenopausal women LI Feng, XU Zhaowan, WANG Bingwu, et al. Department of Orthopaedics, Weifang People's Hospital, Weifang Shandong 261031, China

Abstract: **Objective** To study the relationship between the LEPR polymorphism and the incidence of osteoporosis and BMD of postmenopausal women. **Methods** 200 postmenopausal women patients with osteoporosis who came to our hospital during 2006.1-2008.1 were selected, and selected 200 postmenopausal women without osteoporosis as control group. Measure the BMD of collum femoris and lumbar vertebra, and examine the genotype of LEPR Gln223Arg by the PCR-RFLP method. **Results** The difference of LEPR genotype between the experiment group and control group is significant($P < 0.05$). And the BMD of lumbar vertebra and the genotype of LEPR gene have the significant relationship($P < 0.05$). The BMD of collum femoris between the 3 genotype have no significant difference($P > 0.05$). **Conclusion** The polymorphism of LEPR Gln223Arg is associated closely with the incidence of osteoporosis and the BMD of lumbar vertebra, have no relationship with the BMD of collum femoris.

Key words: LEPR; Osteoporosis; Polymorphism; BMD

骨质疏松症已成为中老年妇女,特别是绝经后妇女的常见病和多发病,其最大的危害是容易发生骨折,尤其是椎骨骨折^[1]。因此,骨质疏松症的防治,已成为妇女保健的重要课题。近年来的研究表明骨质疏松性骨折与骨峰值和骨量丢失率相关,相继有学者发现维生素 D 受体、雌激素受体、I 型胶原、降钙素受体、白细胞介素 6 等的基因多态性与骨

密度相关^[2-4]。

本研究选取绝经后妇女为研究对象,研究该群体发生骨质疏松症的概率与瘦素受体基因多态 Gln223Arg 的相关性,为探索老年妇女骨质疏松症的有效防治措施提供理论依据,提高人群的健康水平 and 生活质量。

1 材料和方法

1.1 对象

研究对象随机选择自 2006 年 1 月~2008 年 1

月到骨科门诊就诊的绝经后女性骨质疏松症患者，共 200 例，选取未发生骨质疏松症的绝经后妇女 200 例作为对照组，均参照《实用骨科学》中提供的诊断标准，且未同时发生甲亢、糖尿病等影响骨质代谢的疾病。每组成员均取外周血 5 mL 用 0.5% EDTA- Na_2 抗凝，用于抽提血细胞中的 DNA，同时测量各组成员股骨颈、腰椎骨的骨密度（DTX200 型，Osteometer 公司）。

1.2 方法

提取 DNA，扩增目的基因：用全血 DNA 提取试剂盒（上海生工提供）提取基因组 DNA。应用下列引物，用 PCR 仪扩增目的基因，P1：5'-ACCCCTTTAAGCTGGGTGTCCCAAATGA-3'，P2：5'-GCTAGCAAATATTTTGTGAAGCAATT-3'（上海生工合成），扩增条件为：95℃预变性 5 min 后进入 30 个周期的循环，循环参数：94℃变性 60 s，55℃复性 60 s，72℃延伸 60 s，最后 72℃后延伸 8 min。用 6% 琼脂糖凝胶电泳分离后（1×TBE，200 V，2 h），硝酸银染色检测 LEPR 基因第 6 外显子 PCR 产物（440 bp）。

瘦素受体基因多态性分析（限制性内切酶消化）：取 PCR 产物 10 μL ，加入限制性内切酶 MspI（购自美国 Promega 公司），37℃酶切 4~6 h，12% 聚丙烯酰胺凝胶分离酶切产物，0.1% 硝酸银染色，碳酸钠显影后直接观察结果，确定受试者瘦素受体基因型并记录。

1.3 统计学处理

用 χ^2 检验分析比较两组间数据，用 χ^2 检验判断基因多态性是否符合 Hardy-Weinberg 平衡定律，用方差分析比较多组间数据，以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 目的基因的扩增

瘦素受体基因第 6 外显子 PCR 反应产物长度为 421 bp，见图 1。

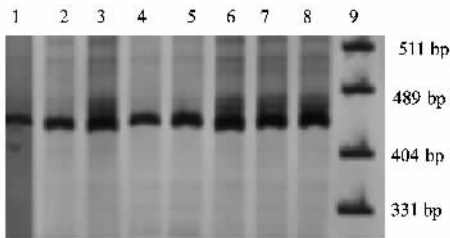


图 1 LEPR 基因第 6 外显子 PCR 产物电泳结果
1~8：PCR 产物 9：Marker

2.2 PCR-RFLP 分析

酶切产物可被 MspI 酶解为 2 个片段 294 bp 带及 127 bp 带。Gln223 纯合子（AA）电泳带型仅 421 bp 带；Arg223 纯合子（GG）电泳带型为 294 bp 带及 127 bp 带；Gln223/Arg223 杂合子（GA）电泳带型为 421 bp 带、294 bp 带及 127 bp 带。

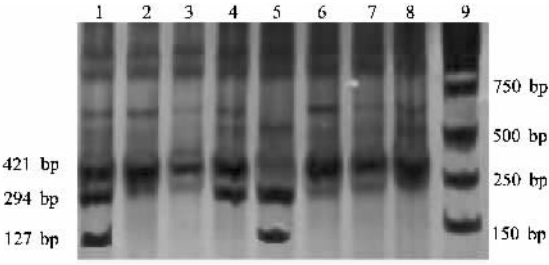


图 2 LEPR 基因 PCR-RFLP 电泳结果
2、3、6、7、8：AA 基因型 4：GG 基因型 1：GA 基因型 9：Marker

2.3 瘦素受体基因多态性与骨质疏松症发生相关性分析

2.3.1 瘦素受体基因多态性与各组骨质疏松症发生率的关系（表 1）

表 1 绝经后妇女骨质疏松症患者与对照组基因型比较

组别	例数	基因型		
		GG	GA	AA
绝经后妇女骨质疏松症患者组	200	102	80	18
对照组（正常绝经后妇女）	200	81	91	28

用 χ^2 检验分析所得数据，结果表明，绝经后妇女骨质疏松症患者中，GG 基因型者人数明显多于 GA 型和 AA 型（ $P < 0.05$ ），而正常绝经后妇女组中 3 种基因型人数差异无显著性意义（ $P > 0.05$ ），见表 1。

另外，经 χ^2 检验分析，两组人群 LEPR 基因 Gln223Arg 多态性分布均符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律。

2.3.2 瘦素受体基因多态性与各组成员脊椎骨与股骨颈骨密度的关系

用方差分析方法分析绝经后骨质疏松症妇女 LEPR 基因型与骨密度的关系，结果显示：200 例绝经后骨质疏松症妇女 LEPR 基因 Gln223/Arg223 各基因型组间股骨颈的 BMD 值差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ），而各基因型组间脊椎骨的 BMD 值差异有统计学意义（ $P < 0.01$ ）。进一步比较发现，GG 组与 AA 组、GG 组与 GA 组之间的 BMD 值差异均有统计学意义（ $P < 0.01$ ， $P < 0.05$ ），而 GA 组与 AA 组间差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）。

3 讨论

瘦素 Leptin, 即 ob 蛋白, 是 ob 基因编码产生。主要由白色脂肪组织产生, 研究表明, 瘦素具有广泛的生物学效应, 多年来学者们对瘦素的研究大都集中在瘦素在脂肪分解、胎盘发育、肿瘤发生等过程中的作用^[5-7]。近期国际上有学者发现瘦素还参与了骨的正常代谢过程, 如 2001 年 Yamauchi 就报道了在成年男性和女性中血清瘦素水平是骨密度(bone mineral density, BMD) 的一个强有力的预测指标, 从而提出人血清中瘦素浓度与骨密度有相关性; 同时 2006 年, Weiss 等^[8]发现这种相关性在女性表现的尤为明显。

瘦素作用的发挥要依靠瘦素受体(Leptin Receptor, Lepr) 的介导, 因此近年来学者们的研究热点又集中在该基因上。人瘦素受体基因位于 1p32, 长度超过 70 kb, 由 20 个外显子和 19 个内含子组成, 且迄今为止已发现了该基因的多种多态, 如 Lys109Arg, Gln223Arg, Lys656Asn, Pro1019Pro 等, 这些多态影响着多种疾病的发生概率。国际上已有多名学者报道了这些多态与肥胖、白血病、肝病等疾病发生的相关性, 如 Koh 等^[9]研究了 Lepr 基因 5 种多态与骨密度的关系, 最终发现, Gln223Arg 这一多态在骨质形成过程起一定的作用, 并且受到雌激素受体基因多态性的影响, 2007 年, Fairbrother 等^[10]研究了 Gln223Arg 这一多态与丹麦绝经后妇女骨密度、椎骨骨折发生率之间的关系, 结果发现绝经后妇女的骨密度与瘦素受体基因型密切相关。

我们的研究结果显示: ①绝经后妇女 LEPR 基因多态性 Gln223Arg 与骨质疏松症的发生密切相关, 即绝经后妇女中 LEPR Gln223Arg 基因型为 GG 组人数明显高于 GA 组及 AA 组($P < 0.05$)。②绝经后妇女 LEPR 基因 Gln223Arg 多态性与其脊椎骨的骨密度密切相关: 即绝经后妇女中 LEPR Gln223Arg 基因型为 GG 型者其脊椎骨的骨密度值

明显高于 AA 基因型者($P < 0.01$)和 GA 基因型者($P < 0.05$), 考虑等位基因 A 为骨量丢失的保护因子。该结果与国外学者研究结果基本一致。

【参 考 文 献】

- [1] 周力学. 绝经后骨质疏松症. 新医学, 2007, 38(9): 611-613.
- [2] Jacobsen DE, Samson MM. Efficacy of tibolone and raloxifene for the maintenance of skeletal muscle strength, bone mineral density, balance, body composition, cognitive function, mood/depression, anxiety and quality of life/well-being in late postmenopausal women $> / = 70$ years: Study design of a randomized, double-blind, double-dummy, placebo-controlled, single-center trial. Trials, 2008, 9: 32.
- [3] Kang BY, Kim JY, Lee KO. Association between an AluI polymorphism in the calcitonin receptor gene and quantitative ultrasound parameters in Korean men. Med Princ Pract, 2007, 16(5): 389-393.
- [4] Mysliwiec J, Zbucki R, Winnicka M, et al. Interleukin-6 is not essential for bone turnover in hypothyroid mice. Folia Histochem Cytobiol, 2007, 45(4): 387-392.
- [5] Heep H, Wedemeyer C, Wegner A, et al. Differences in trabecular bone of leptin-deficient ob/ob mice in response to biomechanical loading. Int J Biol Sci, 2008, 4(3): 169-175.
- [6] Nakatsukasa H, Masuyama H, Takamoto N, et al. Circulating Leptin and Angiogenic Factors in Preeclampsia Patients. Endocr J, 2008 [Epub ahead of print].
- [7] Gong C, Liu Y, Xiao W, et al. The role of ERK1/2 in leptin promoting the proliferation of human endometrial cancer cell line. Ai Zheng, 2007, 26(11): 1211-1214.
- [8] Weiss LA, Barrett-Connor E, von Mühlen D, et al. Leptin predicts BMD and bone resorption in older women but not older men: the Rancho Bernardo study. J Bone Miner Res, 2006, 21(5): 758-764.
- [9] Koh JM, Kim DJ, Hong JS, et al. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms Pvu II and Xba I influence association between leptin receptor gene polymorphism(Gln223Arg) and bone mineral density in young men. Eur J Endocrinol, 2002, 147(6): 777-783.
- [10] Fairbrother UL, Tankó LB, Walley AJ, et al. Leptin receptor genotype at Gln223Arg is associated with body composition, BMD, and vertebral fracture in postmenopausal Danish women. J Bone Miner Res, 2007, 22(4): 544-550.

(收稿日期: 2009-02-23)