

福州地区汉族老年男性维生素 D 受体基因多态性与骨密度的关系

李生强 葛继荣 谢冰颖 薛莲 谢丽华 陈可 赖玉链

中图分类号: R589.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)08-0598-04

摘要:目的 观察福州地区汉族老年男性维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)基因 BsmI, ApaI 及 TaqI 多态性分布及与骨密度的关系。方法 选择福州地区 60 岁以上汉族男性 150 例,检测其正位第 2-4 腰椎、左侧股骨颈、大转子和 Ward's 区骨密度,应用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)检测维生素 D 受体基因 BsmI, ApaI 及 TaqI 多态性。结果 受试对象中, VDR BsmI 基因型分别为 BB 型 5 例(占 3.3%)、Bb 型 11 例(占 7.3%)、bb 型 134 例(占 89.4%), b 等位基因频率为 93.0%、B 等位基因频率为 7.0%; ApaI 基因型分别为 AA 型 12 例(占 8.0%)、Aa 型 64 例(占 42.7%)、aa 型 74 例(占 49.3%), A 等位基因频率为 29.3%、a 等位基因频率为 70.7%; TaqI 基因型分别为 TT 型 136 例(占 90.7%)、Tt 型 14 例(占 9.3%), 无 tt 型, T 等位基因频率为 95.3%、t 等位基因频率为 4.7%。分析基因型与骨密度的关系显示:三个多态性位点各基因型人群在腰椎、股骨颈、大转子、Ward's 区 4 个部位骨密度差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 维生素 D 受体基因 BsmI, ApaI 及 TaqI 多态性与骨密度间没有关联,尚不能作为预测福州地区老年男性发生骨质疏松危险性的遗传标志。

关键词: 维生素 D 受体; 基因多态性; 骨密度; 福州; 男性

doi: 10.3969/j.issn.1006-7108.2009.08.013

The relationship between polymorphisms of vitamin D receptor gene and bone mineral density in Fuzhou elderly male LI Shengqiang, GE Jirong, XIE Bingying, et al. Chinese Medicine Research Lab of Fujian Province, Fuzhou 350003, China

Abstract: **Objective** To investigate the prevalence of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphism in Fuzhou elderly male, and to study the association between BsmI, ApaI, TaqI polymorphism of VDR gene and bone mineral density (BMD). **Methods** BMD of lumbar spine, femoral neck, troch and Ward's triangle were measured by dual-energy X-ray absorptionmetry. The genotypes of VDR gene of 150 male was detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). **Results** The distribution of VDR BsmI genotypes in 150 male was BB genotype 5 (3.3%), Bb 11 (7.3%), bb 134 (89.4%) and the b allelic gene frequencies reached 93.0% while B was 7.0%. The distribution of VDR ApaI genotype was AA genotype 12 (8.0%), Aa 74 (42.7%), aa 64 (49.3%), respectively. The A allelic gene frequencies reached 29.3% while a was 70.7%. There were only two genotypes found among the people with TT genotypes 136 (90.7%) and Tt 14 (9.3%). The T and t frequencies were 95.3% and 4.7% respectively. There was no significant difference in BMD of lumbar spine, femoral neck, troch and Ward's triangle among genotypes of each polymorphism site. **Conclusion** There was no significant relationship between gene polymorphism of VDR and BMD in Fuzhou elderly men, and it is not regarded as a genetic marker in predicting the risk of developing osteoporosis in Fuzhou elderly male.

Key words: Vitamin D receptor(VDR); Gene polymorphism; Bone mineral density (BMD); Fuzhou; Male

基金项目: 福建省自然科学基金计划资助项目(X0750038), 福建省卫生厅青年科研课题资助项目(2006-2-18)

作者单位: 350003 福州, 福建省中医药研究院中基室

通讯作者: 李生强, Email: juyuan21@163.com

骨质疏松症是以骨量减少,骨组织微细结构破坏导致脆性增加和骨折危险性增加为特征的一种系统性、全身性骨骼疾病,它多发于绝经后妇女,在男性发病率较低,以致未受到重视。1994 年 Morrison 等^[1]报道维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)基因与骨密度(bone mineral density, BMD)相关,此后种族和遗传与骨密度的关系受到广泛的关注和研究,但多数研究集中在绝经后妇女中进行,男性报道较少。笔者针对福州地区 60 岁以上汉族男性,在分析 VDR 基因型分布频率的基础上,进一步观察 VDR 与 BMD 的关系,探讨老年男性骨质疏松发病的遗传机制,以期从遗传标志方面为筛查骨质疏松高危人群提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 对象

选择 2007 年 2 月至 2008 年 4 月福建省中医药研究院体检或骨科门诊福州地区汉族老年男性 150 例,年龄(69.0 ± 5.3)岁,体重(66.5 ± 9.1) kg, BMI 指数 24.2 ± 3.1,均对检测项目知情同意。排除标准 继发性骨质疏松、患有影响骨代谢的疾病及长期服用影响骨代谢药物者。

1.2 方法

1.2.1 试剂:血液基因组 DNA 抽提试剂盒, Taq DNA 聚合酶, dNTP, 10xPCR 缓冲液(北京天根生物公司), 维生素 D 受体引物(上海生工生物工程有限公司合成), BsmI 多态性检测引物:P1: 5'-CAA CCA AGA CTA CAA GTA CCG CGT CAG TGA-3'; P2: 5'-AAC CAG CGG GAA GAG GTC AAG GG-3'^[2]; ApaI 及 TaqI 多态性检测引物:P1: 5'-CAG AGC ATG GAC AGG GAG CAA G-3'; P2: 5'-GCA ACT CCT CAT GGC TGA GGT CTC A-3'^[3]。内切酶 BsmI (Mva1269 I, MBI Fermentas); ApaI、TaqI(大连宝生物公司)。

1.2.2 骨密度检测:使用法国 MEDILINK 双能 X 射线骨密度仪(精度 < 1%, 质控后变异系数为 0.65%)检测正位 L₂₋₄ 腰椎、左侧股骨颈、大转子和 Ward's 区骨密度,同时记录患者自身因素 年龄、身高、体重。

1.2.3 VDR 基因多态性检测:BsmI 多态性检测方法见我们之前的报道^[4]。ApaI 及 TaqI 多态性检测 静脉取血, ACD 抗凝, DNA 试剂盒提取 DNA。聚合酶链反应扩增(PTC-200MJ 梯度 PCR 仪):反应体系 50 μL, 10xPCR 缓冲液 5 μL, 10 mmol/L dNTP 2 μL, 引物 P1, P2 各 0.5 μmol 模板 DNA 250 ng。反应条

件 94 ℃ 变性 3 min, 68 ℃ 45 s, 72 ℃ 45 s, 30 次, 最后 72 ℃ 延伸 10 min。限制性片段长度多态性分析: 取扩增产物 5 μL, 加 2 μL ApaI 或 TaqI, 10xPCR 缓冲液 1.4 μL, 蒸馏水 6.6 μL, 混均置 37 ℃ 水浴过夜。取反应产物 10 μL, 20 g/L 琼脂糖电泳, EB 染色。基因型判断: AA 型(740 bp), Aa 型(740 bp, 515bp, 225 bp), aa 型(515 bp, 225 bp); TT 型(495 bp, 245 bp), Tt 型(495 bp, 290 bp, 245 bp, 205 bp), tt 型(290 bp, 245 bp, 205 bp)。

1.3 统计学分析

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 描述, 正态分布用 *t* 检验, 非正态分布用 Wilcoxon 秩和检验。P < 0.05 为差异有显著性, 双侧检验。基因型或等位基因频率比较采用卡方检验, 统计学处理采用 SAS 8.2 软件完成。

2 结果

2.1 维生素 D 受体基因三个酶切位点多态性分布

VDR BsmI 基因型分布频率分别为 BB 型 5 例(占 3.3%)、Bb 型 11 例(占 7.3%), bb 型 134 例(占 89.4%), b 等位基因频率为 93.0%、B 等位基因频率为 7.0%; ApaI 基因型分别为 AA 型 12 例(占 8.0%)、Aa 型 74 例(占 42.7%), aa 型 64 例(占 49.3%), A 等位基因频率为 29.3%、a 等位基因频率为 70.7%; TaqI 基因型分别为 TT 型 136 例(占 90.7%)、Tt 型 14 例(占 9.3%), 无 tt 型。T 等位基因频率为 95.3%、t 等位基因频率为 4.7%。基因型频率分布均达到 Hardy-weiberg 平衡, 表明人群基因型频率具有代表性。

2.2 维生素 D 受体 BsmI 多态性与骨密度关系(表 1)

表 1 维生素 D 受体 BsmI 多态性各基因型间骨密度比较

项目	BB	Bb	bb
例数	5	11	134
年龄(岁)	66.6 ± 5.2	66.6 ± 6.0	69.3 ± 5.3
身高(cm)	165.4 ± 5.5	165.4 ± 6.2	165.9 ± 5.8
体重(kg)	77.8 ± 10.2	61.7 ± 14.4	66.7 ± 9.2
BMI	28.4 ± 2.9	22.4 ± 4.4	24.3 ± 3.1
第 2-4 腰椎(g/cm ²)	0.869 ± 0.089	0.868 ± 0.127	0.881 ± 0.122
股骨颈(g/cm ²)	0.722 ± 0.065	0.834 ± 0.135	0.794 ± 0.122
Ward's 区(g/cm ²)	0.601 ± 0.087	0.637 ± 0.169	0.627 ± 0.153
大转子(g/cm ²)	0.900 ± 0.068	0.793 ± 0.148	0.841 ± 0.152

由表 1 可见, BsmI 基因型各组之间年龄、身高差异没有显著性, 但 BB 组可能由于例数少, 体重及 BMI 指数均比 Bb 及 bb 组高(P < 0.05)。采用协方差分析各部位骨密度与基因型之间关系, 三个基因型组之间四部位骨密度差异均无统计学意义(P >

0.05)。

2.3 维生素 D 受体 *ApaI* 多态性与骨密度关系 (表 2)

由表 2 可见, *ApaI* 基因型各组之间年龄、身高、体重、BMI 之间差异没有显著性。四部位骨密度在各组间差异无显著性。

表 2 维生素 D 受体 *ApaI* 各基因型骨密度比较

项目	AA	Aa	aa
例数	12	64	74
年龄(岁)	69.0± 5.5	69.4± 5.2	68.8± 5.6
身高(cm)	162.8± 6.6	166.1± 5.5	166.0± 5.9
体重(kg)	68.8± 11.0	66.7± 11.4	66.4± 8.4
BMI	25.9± 3.4	24.1± 3.7	24.1± 3.0
第 2-4 腰椎骨密度(g/cm ²)	0.884± 0.100	0.863± 0.122	0.893± 0.123
股骨颈骨密度(g/cm ²)	0.750± 0.096	0.796± 0.121	0.801± 0.127
Ward's 区骨密度(g/cm ²)	0.598± 0.128	0.618± 0.154	0.640± 0.154
大转子骨密度(g/cm ²)	0.835± 0.138	0.823± 0.147	0.853± 0.156

2.4 老年男性维生素 D 受体 *TaqI* 多态性与骨密度关系 (表 3)

表 3 维生素 D 受体 *TaqI* 两基因型骨密度比较

项目	TT	Tt
例数	136	14
年龄(岁)	69.2± 5.4	67.9± 5.5
身高(cm)	165.8± 5.9	165.7± 5.4
体重(kg)	66.8± 9.7	66.1± 12.2
BMI	24.3± 3.2	24.0± 4.2
第 2-4 腰椎骨密度(g/cm ²)	0.883± 0.123	0.842± 0.100
股骨颈骨密度(g/cm ²)	0.794± 0.121	0.802± 0.134
Ward's 区骨密度(g/cm ²)	0.627± 0.152	0.633± 0.155
大转子骨密度(g/cm ²)	0.838± 0.153	0.854± 0.120

由表 3 可见, *TaqI* 基因型两组之间年龄、身高、体重、BMI 之间差异没有显著性。四部位骨密度在 TT、Tt 两组间差异仍然无显著性。

3 讨论

维生素 D 在骨的正常新陈代谢中扮演着非常重要的角色,它通过广泛分布于体细胞的维生素 D 受体发挥作用。VDR 基因定位于人类第 12 号染色体长臂 1 区 3 带(12q13)上,有 14 个外显子和多个内含子^[5,6]。目前研究已发现 VDR 基因有多个位点的单核苷酸多态性可能与骨代谢密切相关,如第 8 内含子的 *BsmI* 和 *ApaI*、第 9 外显子的 *TaqI* 及 5'端 *FokI* 的酶切位点,但从不同地区、人种得出的研究结果存在较大差异,维生素 D 受体基因是否与骨质疏松相关仍然具有争议。

(1) *BsmI* 基因型分布与 BMD 本研究结果显示,福州地区汉族男性 *BsmI* 基因型分别为 BB 型为 3.3%、Bb 型为 7.3%,bb 型占 89.4%。基因型分布

频率与福州地区绝经后妇女基本一致^[4],与北京地区男性人群的报道也很接近^[7],与 bb 型不到 50% 的广州地区男性人群相比具有差异性^[8],上海地区^[9]则未发现 BB 型。综合国内外已报道的结果,亚洲地区人群 bb 基因型比例较高,一般在 80% ~ 90%,而高加索人群的报道 Bb 基因型比例较高,达到 50% 左右,表明 VDR 基因型分布频率存在着明显的人种差异。进一步分析 *BsmI* 多态性与骨密度的关系,正位第 2 ~ 4 腰椎、左侧股骨颈、大转子和 Ward's 区四部位骨密度在各基因型之间差异并无显著性,表明 VDR *BsmI* 多态性与福州地区老年男性无相关性,这与国内外大部分报道是一致的^[3,9,10],但也有不同的报道,广州^[8]地区的研究表明 Bb 型 BMD 值最高。

(2) *ApaI* 基因型分布与 BMD :*ApaI* 基因型分别为 AA 型占 8.0%、Aa 型占 42.7%,aa 型占 49.3%,基因型分布频率与台湾^[11]、上海^[12]、香港地区^[13]男性人群的报道极为接近,但与高加索人群不同。Morrison 的研究显示高加索人群 A 等位基因频率占大多数,而上海男性与本研究人群 a 等位基因均达到 70%,这说明 VDR *ApaI* 基因型频率同样存在着明显的人种差异。对于 *ApaI* 多态性与男性骨密度的关系,本研究并未发现 *ApaI* 多态性与老年男性骨密度相关,这与台湾、香港、湖南等^[14]地区的报道是一致的。对上海^[12] 60 岁以上男性人群的研究发现 AA 具有较高的骨量,认为 *ApaI* 多态性与老年男性骨量丢失相关。国外的报道则存在争议,Bell^[3]对黑人及白人年轻男性的研究发现,*ApaI* 多态性在两个种族人群中均与腰椎骨密度相关,Langdahl 等^[15]的研究则未发现相关性。

(3) *TaqI* 基因型分布与 BMD :对于男性 VDR *TaqI* 多态性的研究较少,本研究中仅有 TT 及 Tt 两种基因型,并未发现 tt 型,其中 TT 型为 90.7%、Tt 型为 9.3%。*TaqI* 基因型分布频率同样存在着种族差异,国内台湾^[11]、香港^[13]等地区 TT 基因型接近 90%,T 等位基因频率占绝对优势,而英国^[16]男性人群 TT 仅占 34%。我们分析 TT 与 Tt 组四部位骨密度,未发现显著性差异,表明 VDR *TaqI* 多态性与男性骨密度无相关性,这与台湾、香港的报道是一致的。虽然欧美的报道^[3,15,16] *TaqI* 基因型分布频率存在种族差异,但也未发现与 BMD 相关。

本研究结果表明福州地区汉族老年男性 VDR 基因的 *BsmI*、*ApaI* 及 *TaqI* 三个多态性位点的基因型分布频率与骨密度无关。国内外针对不同的人群

所得出的结论多数倾向认为没有相关性,但仍有争议性,造成这种差异是多因素的,人种、地域、样本量及分析方法都会对结果产生影响,同时男性骨密度还受环境因素如营养、运动、吸烟、饮酒等的影响。笔者认为维生素 D 受体基因 *BsmI*、*ApaI* 及 *TaqI* 多态性与老年男性 BMD 间没有关联,尚不能作为预测福州地区老年男性发生骨质疏松危险的遗传标志。

【参 考 文 献】

- [1] Morrison NA, Chengqi J, Tokita A, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature*, 1994, 367 (6460) : 284-287.
- [2] Donáth J, Speer G, Poór G, et al. Vitamin D receptor, oestrogen receptor- α and calcium-sensing receptor genotypes, bone mineral density and biochemical markers in Paget's disease of bone. *Rheumatology*, 2004, 43 (6) : 692-695.
- [3] Bell NH, Morrison NA, Nguyen TV, et al. *ApaI* polymorphisms of the vitamin D receptor predict bone density of the lumbar spine and not racial difference in bone density in young men. *J Lab Clin Med*, 2001, 137 (2) : 133-140.
- [4] Li Shengqiang, GE Jirong, XIE Lihua, et al. The association between *BsmI* polymorphism of vitamin D receptor gene and bone mineral density in Fuzhou postmenopausal females. *J Fujian Med Univ*, 2008, 42 (3) : 259-261.
- [5] Taymans SE, Pack S, Pak E, et al. The human vitamin D receptor gene (VDR) is localized to region 12cen-q12 by fluorescent in situ hybridization and radiation hybrid mapping: genetic and physical VDR map. *J Bone Miner Res*, 1999, 14 (7) : 1163-1166.
- [6] Crofts LA, Hancock MS, Morrison NA, et al. Multiple promoters direct the tissue-specific expression of novel N-terminal variant human vitamin D receptor gene transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95 (18) : 10529-10534.
- [7] LIU Jie, MIAO Yide, HE Peiying, et al. Study on the relationship between vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density in old men. *Chin J Osteoporos*, 2005, 11 (2) : 159-162.
- [8] WU Wen, FU Zuzhi. The frequencies of the vitamin D receptor gene alleles and its association with bone mineral density in adults of Han nationality in Guangzhou area. *Chin J Osteoporos*, 2004, 10 (3) : 304-307.
- [9] Miao YX, Zhu HM, Zhu XY, et al. Relationship between bone mineral density and polymorphism of vitamin D receptor gene in 611 Hans. *Chin J Endocrinol Metab*, 2005, 21 (5) : 448-449.
- [10] Garnero P, Munoz F, Borel O, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with the risk of fractures in postmenopausal women, independently of bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90 (8) : 4829-4835.
- [11] Tsai KS, Hsu SH, Cheng WC, et al. Bone mineral density and bone markers in relation to vitamin D receptor gene polymorphisms in Chinese men and women. *Bone*, 1996, 19 (5) : 513-518.
- [12] Huang QR, Zhang ZL, Qin YJ, et al. Association of *ApaI* Polymorphism of vitamin D receptor gene with bone mass in men. *Acta acad med sin*, 2003, 25 (3) : 254-257.
- [13] Lau EMC, Young RP, Ho SCH, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density in elderly Chinese men and women in Hong Kong. *Osteoporosis Int*, 1999, 10 : 226-230.
- [14] Long JR, Zhang YY, Liu PY, et al. Association of estrogen receptor alpha and vitamin D receptor gene polymorphisms with bone mineral density in Chinese males. *Calcif Tissue Int*, 2004, 74 (3) : 270-276.
- [15] Langdahl BL, Gravholt CH, Brixen K, et al. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and bone mass, bone turnover and osteoporotic fracture. *Eur J Clin Invest*, 2000, 30 (7) : 608-617.
- [16] Rees Gs, Symes EK, Nicholl CG, et al. Lack of correlation of free deoxypyridinoline excretion with *TaqI* restriction length polymorphisms in the vitamin D receptor gene in males. *Clin Chim Acta*, 1998, 272 (2) : 149-157.

(收稿日期: 2009-04-07)