

# 维生素 D 受体基因 Taq I 多态性与绝经后妇女骨密度的关系

薛莲 谢丽华 陈可 赖玉链 李生强 葛继荣

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)11-0797-04

**摘要:**目的 了解福州地区绝经后妇女维生素 D 受体基因 Taq I 多态性的分布,探讨维生素 D 受体基因 Taq I 多态性与绝经后妇女骨密度的关系。方法 用双能 X 线骨密度仪检测 592 例绝经后妇女的腰椎、股骨颈、大转子及 Ward's 三角骨密度,应用 PCR-RFLP 技术检测维生素 D 受体基因 Taq I 多态性。结果 ①维生素 D 受体基因型分布频率为 TT 型 90.37%, tt 型 0.17%, Tt 型 9.46%。等位基因频率为 T 95.1%, t 4.9%。基因型分布符合 Hardy-Weinberg 定律。②分析其基因型与骨密度的关系:TT、tt、Tt 3 种基因型在腰椎、股骨颈、大转子、Ward's 区 4 个部位骨密度差异均无显著性。结论 维生素 D 受体基因 Taq I 多态性与骨密度间无关联,不能作为预测福州地区绝经后妇女发生骨质疏松危险性的遗传标志。

**关键词:** 绝经后妇女; 骨密度; 维生素 D 受体基因; 多态性

DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2009.11.002

**The relationship between Taq I polymorphism of VDR gene and bone mineral density in postmenopausal women in Fuzhou** XUE Lian, XIE Lihua, CHEN Ke, et al. Fujian Institute of Chinese Medicine, Fuzhou 350003, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the prevalence of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphism in Fuzhou postmenopausal women and to study the relationship between Taq I polymorphism of VDR gene with bone mineral density (BMD). **Methods** BMD of lumbar spine, femoral neck, trochanter and Ward's triangle of 592 postmenopausal women were measured by dual energy X-ray absorptiometry. The genotype of VDR gene was determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). **Results** ①The distribution of VDR genotypes were TT 90.37%, tt 0.17%, Tt 9.46%, respectively. The T allelic gene frequencies reached 95.1%, while t was 4.9%. The distribution followed the Hardy-Weinberg equilibrium. ②Analysis of the relationship between the genotypes and BMD: There is no significant difference in BMD of lumbar spine, femoral neck, trochanter and Ward's triangle among the three genotypes. **Conclusion** Taq I gene polymorphism of VDR is not correlated to BMD, and there is not enough evidence to support genotype of VDR as a genetic marker in predicting the risk of developing osteoporosis in Fuzhou postmenopausal female.

**Key words:** Postmenopausal women; Bone mineral density; Vitamin D receptor; Polymorphism

骨质疏松是老年人常见的疾病之一。它被认为是一种骨量降低、骨的微观结构退化,致使脆性增加最后导致骨折的疾病。越来越多的研究发现,遗传因素在骨质疏松的发病中起着重要的作用<sup>[1,2]</sup>。维生素 D 受体基因是目前国际上有关骨质疏松最

受关注并且也最有争议的候选基因之一。维生素 D 受体是介导  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  发挥生物效应的核内生物大分子,为类固醇激素/甲状腺激素受体超家族的成员,其与  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  激素信号分子在靶细胞结合后形成激素-受体复合物,对靶基因的转录和翻译进行调控,进而调节钙和磷的代谢,在调节细胞增殖、分化等方面也起重要作用,成为骨、内分泌学的研究热点<sup>[3]</sup>。Horst 等<sup>[4]</sup>认为维生素 D 受体基因 Taq I 多态性与骨密度变化有显著相关性,但许多学者

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30672703)

作者单位: 350003 福州 福建省中医药研究院中医基础室

通讯作者: 葛继荣, Email: gjrjgcy@sohu.com

的看法并不一致。为此,本研究选取福州地区绝经后妇女为研究对象,研究该群体 Taq I 基因多态性与骨密度之间的相关性,为筛选骨质疏松高危人群提供理论依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 研究对象

从福州地区常住汉族人口中随机筛选绝经后妇女 592 例,年龄 48~84 岁,平均(62.19±6.32)岁,绝经年限 1~37 年,平均(12.96±7.36)年;身高 1.40~1.70 m,平均(1.56±0.05) m;体重 32.00~97.00 kg,平均(58.03±8.64) kg;体质指数 12.5~38.27 kg/m<sup>2</sup>,平均(23.91±3.18) kg/m<sup>2</sup>;骨质疏松症诊断标准参照中国人骨质疏松症建议诊断标准<sup>[5]</sup>;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。研究对象均知情同意,符合医学伦理学。

### 1.2 主要试剂和仪器

双能 X 射线骨密度仪(法国 Medilink 公司 OSTEOCORE 型),校正后精密度:<1%;PCR 仪(美国 PTC-200 型);DNA 试剂盒(杭州博日科技有限公司);2×Taq Plus PCR Master Mix(天根生化科技有限公司);引物(上海生工生物工程有限公司)序列为:P1:5'-CAG AGC ATG GAC AGG GAG CAA-3';P2:5'-GCA ACT CCT CAT GGC TGA GGT CTC-3'<sup>[6]</sup>;限制性内切酶 Taq I(宝生物工程(大连)有限公司)。

### 1.3 骨密度检测

采用双能 X 射线骨密度仪检测正位腰椎(L<sub>2-4</sub>)、左侧股骨颈、大转子和 Ward's 三角区的骨密度。

### 1.4 维生素 D 受体基因 Taq I 多态性检测

静脉取血,ACD 抗凝,用 DNA 试剂盒从白细胞中提取 DNA。PCR 反应体系 50 μl:PCR Master Mix 25 μl, ddH<sub>2</sub>O 15 μl,引物各 2.5 μl, DNA 5 μl;反应条件:94℃预变性 4 min,94℃变性 45 s,68℃退火 45 s,72℃延伸 45 s,30 次循环,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 Taq I,10×PCR 缓冲液 2 μl,蒸馏水 11 μl,混匀置 65℃水浴过夜。取反应产物 10 μl,20 g/L 琼脂糖电泳,EB 染色。Taq I 基因型判断:TT 型(495 bp,245 bp),Tt 型(495、290、205、245 bp),tt 型(290、205、245 bp)。

### 1.5 统计学处理

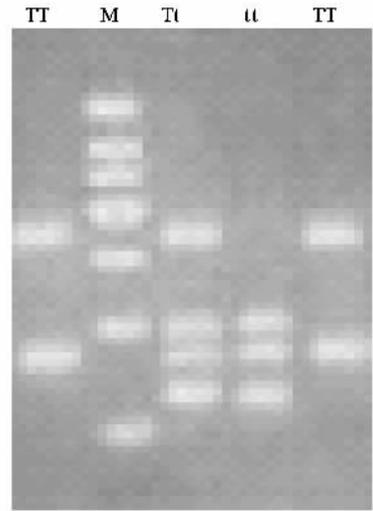
计数资料用卡方检验,用卡方检验判断基因多态性是否符合 Hardy-Weinberg 定律。计量资料用  $\bar{x}$

±s 表示,SPSS 13.0 软件进行分析,非正态分布数据比较采用 Wilcoxon 秩和检验, $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 维生素 D 受体基因 Taq I 多态性酶切结果

根据酶切片段大小确定 Taq I 基因型,TT 基因型显示 495 bp 和 245 bp 2 条带,杂合子 Tt 基因型显示 495、290、245、205 bp 4 条带,tt 型显示 290、245、205 bp 3 条带(图 1)。



M:150bp DNA Ladder Marker(从上到下条带依次为 1200、900、750、600、450、300、150 bp)

图 1 维生素 D 受体基因 Taq I 多态性酶切结果

### 2.2 维生素 D 受体基因 Taq I 多态性检测结果

592 例 VDR 基因 Taq I 多态性检测结果为 TT 型 535 例(90.37%),tt 型 1 例(0.17%),Tt 型 56 例(9.46%);T 等位基因频率为 95.1%,t 等位基因频率为 4.9%,经统计学处理,基因频率分布符合 Hardy-Weinberg 定律。

### 2.3 不同人群中维生素 D 受体基因 Taq I 基因频率分布

福州地区、北京地区及其他不同国家人种的比较见表 1。表 1 显示,福州地区维生素 D 受体基因 Taq I 基因频率分布与北京地区的报道几乎一致,与台湾地区差异也无显著性( $P > 0.05$ )。但是与南非黑人、南非白人、印度人、土耳其、法国、美国人比较,差异有非常显著性( $P < 0.01$ )。

表1 不同人群维生素D受体基因 Taq I 位点多态性频率分布(%)

组别	例数	基因型频率			等位基因频率		作者
		TT	Tt	tt	T	t	
福州地区	592	90.37	9.46	0.17	95.1	4.9	本研究
北京地区	110	90	10	0	95	5	章振林 <sup>[7]</sup>
北京地区	115	90.43	9.57	0	95.2	4.8	赵金秀 <sup>[8]</sup>
台湾地区	113	96.5	3.5	0	98.2	1.8	Tsai KS <sup>[9]</sup>
南非黑人 <sup>#</sup>	287	65	31	4	80.5	19.5	Ojwang <sup>[10]</sup>
南非白人 <sup>#</sup>	239	36	48	16	60	40	Ojwang
印度人 <sup>#</sup>	175	35	54	11	62	38	Ojwang
土耳其 <sup>#</sup>	246	38	49	13	63.5	37.5	Uysal AR <sup>[6]</sup>
法国 <sup>#</sup>	189	33	49	18	57.5	42.5	Gamero P <sup>[11]</sup>
美国 <sup>#</sup>	130	27	56	17	55	45	Riggs BL <sup>[12]</sup>

注:与本研究比较<sup>#</sup>  $P < 0.01$

## 2.4 维生素D受体基因 Taq I 多态性与腰椎、股骨颈、大转子和 Ward's 三角区骨密度关系

为了排除年龄、身高、体重及体重指数对骨密度的影响,在比较两基因型组骨密度之前,我们比较 TT 与 Tt 型的年龄、身高、体重及体重指数,结果均无明显差异( $P > 0.05$ ),说明两基因型的年龄、身

高、体重及体重指数具有可比性。TT 型、Tt 型和 tt 型 3 组基因型和各部位骨密度关系见表 2。与 Tt、tt 组相比,TT 基因型在第 2~4 腰椎、股骨颈、大转子、Ward's 三角区各部位均有较高的骨密度,但统计学处理差异无显著性( $P > 0.05$ )。

表2 3种 Taq I 基因型骨密度比较( $\bar{x} \pm s$ , g/cm<sup>2</sup>)

基因型	n	第2~4腰椎	股骨颈	大转子	Ward' 区
TT	535	0.760 ± 0.123	0.810 ± 0.117	0.782 ± 0.116	0.649 ± 0.136
tt	1	0.617	0.815	0.621 <sup>a</sup>	0.521 <sup>a</sup>
Tt	56	0.772 ± 0.129	0.819 ± 0.132	0.798 ± 0.134	0.660 ± 0.151

## 3 讨论

维生素D受体基因位于12号染色体长臂1区3带(12q13)上,全长75kb,包含11个外显子和数个内含子,目前发现的与骨代谢有关的基因多态性位点主要有4个,即BsmI、ApaI、FokI、Taq I。其中FokI位点位于基因5'端,BsmI和ApaI酶切位点位于第8内含子上;Taq I酶切位点位于3'末端非翻译区第9外显子上,它的突变可能不影响维生素D受体蛋白质的表达。本研究通过调查福州地区汉族绝经后妇女592例,其维生素D受体基因 Taq I 基因频率分布情况是:TT 基因型 90.37%、tt 基因型 0.17%、Tt 基因型 9.46%,T 等位基因频率为 95.1%,t 等位基因频率为 4.9%。本研究结果同国内外同类研究结果相比较,结果表明维生素D受体基因 Taq I 多态性分布频率与章振林<sup>[7]</sup>、赵金秀<sup>[8]</sup>报道的北京地区汉族妇女的研究结果基本一致,同台湾<sup>[9]</sup>的报道也相似,但与国外其他地区人种<sup>[10-12]</sup>有显著性差异

( $P < 0.01$ )。本研究发现福州地区汉族绝经后妇女 TT 基因型频率较高,占 90% 以上,并发现 1 例 tt 基因型,在以往研究中,均未见 tt 基因型,这是本研究首次报道汉族绝经后妇女存在 tt 基因型。与汉族人比较,黑人也以 TT 基因型分布的人最多,Tt 基因型占第二,跟汉族人比较接近,而其他地区人种分布最多的是 Tt 基因型,其次为 TT,最后为 tt 基因型。南非白人、印度人、土耳其、法国、美国人 TT 基因频率在 27%~38% 之间,tt 基因型频率在 11%~18% 之间,Tt 基因型频率最高。这些研究进一步证实了种族不同可导致维生素D受体基因 Taq I 位点多态性分布频率不同,说明不同种族的骨质疏松发病差异是有遗传基础的。

进一步分析维生素D受体基因 Taq I 位点多态性与绝经后妇女骨密度的关系,本研究结果 Taq I 位点多态性与各部位骨密度的相关性并不显著,提示维生素D受体基因 Taq I 多态性尚不能作为预测福州地区绝经后妇女发生骨质疏松危险的遗传标

志。与之前的研究结论<sup>[13]</sup>是一致的,与多个国内外研究结果 Taq I 基因型与骨密度的无关的分析也是相一致的。章振林等<sup>[7]</sup>通过研究了 110 例北京地区绝经后妇女 Taq I 位点多态性,未见 Taq I 基因型与腰椎 L<sub>2-4</sub>、股骨颈、Ward's 三角和大转子区的 BMD 值有关联。Tsai 等<sup>[9]</sup>研究了 113 例台湾地区绝经前妇女,也未发现各部位骨密度与 Taq I 基因型有关联。Jaramillo 等<sup>[14]</sup>也未发现墨西哥女性各部位骨密度与 Taq I 基因型相关。Quevedo 等<sup>[15]</sup>、McClellan E 等<sup>[16]</sup>报道智利及北爱尔兰地区骨折妇女与健康妇女的 Taq I 基因多态性差异均无显著性。但也有结论不同的报道:Horst 等<sup>[4]</sup>发现波兰地区 TT 基因型人群面临着更高的骨折风险。Iki 等<sup>[17]</sup>报道 TT 基因型的骨密度最低,同时骨丢失也最快。Mitra 等<sup>[18]</sup>报道印度地区成年妇女 TT 基因型比 tt 基因型腰椎骨密度高了 18.5%,臀部骨密度高了 13.2%,差异均达到显著性;且骨质疏松组与正常组的 tt 基因频率也达到差异显著性。

关于维生素 D 受体基因 Taq I 多态性与骨质疏松关系的报道存在这么多差异的原因,可能在于骨质疏松是一种复杂的多因子疾病,它不仅与种族、地域、环境有很大关系,而且还与基因间的协同作用及基因与环境的交互作用有关。因此,探索骨质疏松的遗传基础,分析多个基因、多个多态位点及环境等因素对骨密度的协同作用是非常重要的。

### 【参 考 文 献】

- [ 1 ] Nguyen TV, Blangero J, Eisman JA. Genetic epidemiological approaches to the search for osteoporosis genes. *J Bone Miner Res*, 2000, 15(3):392-401.
- [ 2 ] Zambrano-Morales M, Borjas L, Fernández E, et al. Association of the vitamin D receptor gene BBAAt haplotype with osteoporosis in post-menopausal women. *Invest Clin*, 2008, 49(1):29-38.
- [ 3 ] 孙平, 蔡德鸿, 黄震. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 对骨代谢的影响. *广东医学*, 2007, 28(1):152-153.
- [ 4 ] Horst-Sikorska W, Wawrzyniak A, Celczyńska-Bajew L, et al. Polymorphism of VDR gene-the most effective molecular marker of osteoporotic bone fractures risk within postmenopausal women from Wielkopolska region of Poland. *Endokrynol Pol*, 2005, 56(3):233-239.
- [ 5 ] 刘忠厚, 杨定焯, 朱汉民, 等. 中国人骨质疏松症建议诊断标准

(第二稿). *中国骨质疏松杂志* 2000, 1(1):1-3.

- [ 6 ] Uysal AR, Sahin M, Gursov A, et al. Vitamin D Receptor Gene Polymorphism and Osteoporosis in the Turkish Population. *Genetic testing*, 2008, 12(4):591-594.
- [ 7 ] 章振林, 赵金秀, 孟迅吾, 等. 维生素 D 受体基因起始密码和 3 端多态性与绝经后妇女骨密度的关系. *中华医学遗传学杂志*, 2003, 20(1):5-8.
- [ 8 ] 赵金秀, 周学瀛, 刘国仰, 等. 北京地区汉族人维生素 D 受体基因多态性分布. *中国医学科学院学报*, 1997, 19(1):18-23.
- [ 9 ] 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.
- [ 10 ] Ojwang PJ, Peqoraro RJ, Rom L, et al. Collagen alpha 1 and vitamin D receptor gene polymorphisms in South African whites, blacks and Indians. *East Afr MED J*, 2001, 78(11):604-607.
- [ 11 ] Gamero P, Borel O, Sorney-Rendu E, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms do not predict bone turnover and bone mass in healthy premenopausal women. *J Bone Miner Res*, 1995, 10(9):1283-1288.
- [ 12 ] Riggs BL, Nquven TV, Melton LJ, et al. The contribution of vitamin D receptor gene alleles to the determination of bone mineral density in normal and osteoporotic women. *J Bone Miner Res*, 1995, 10(6):991-996.
- [ 13 ] 葛继荣, 谢丽华, 陈可, 等. 维生素 D 受体基因多个位点多态性与绝经后妇女骨密度及骨转换生化标志物的关系. *中国组织工程与临床康复*, 2009, 13(28):5593-5596.
- [ 14 ] Jaramillo-Rangel G, Cerda-Flores RM, Cardenas-Ibarra L, et al. Vitamin D receptor polymorphisms and bone mineral density in Mexican women without osteoporosis. *Am J Hum Biol*, 1999, 11(6):793-797.
- [ 15 ] Quevedo LI, Martínez BM, Castillo NM, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and risk of hip fracture in Chilean elderly women. *Rev Med Chil*, 2008, 136(4):475-481.
- [ 16 ] McClellan E, Archbold GP, Taqqart HM, et al. Do the COL1A1 and Taq I Vitamin D receptor polymorphisms have a role in identifying individuals at risk of developing osteoporosis? *Ulster Med J*, 2003, 72(1):26-33.
- [ 17 ] Iki M, Saito Y, Dohi Y, et al. Greater trunk muscle torque reduces postmenopausal bone loss at the spine independently of age, body size, and vitamin D receptor genotype in Japanese women. *Calcif Tissue Int*, 2002, 71(4):300-307.
- [ 18 ] Mitra S, Desai M, Ikram Khatkhatay M, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density in postmenopausal Indian women. *Maturitas*, 2006, 55(1):27-35.

(收稿日期:2009-07-12)