

• 论著 •

甲状旁腺素和维生素 D受体基因多态对糖尿病患者骨密度的影响

程洁 翟木绪 姜宏卫 柳林 董砚虎

中图分类号: R587.1 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2010)01-0009-04

摘要: 目的 探讨甲状旁腺素 (PTH) 基因多态性与中国北方汉族人糖尿病患者骨密度的关系, 联合分析维生素 D 受体 (VDR) 基因和 PTH 基因多态性与骨密度的相关性。方法 选自青岛市内分泌糖尿病医院 1998 年 1 月 ~ 2002 年 1 月住院的糖尿病患者, 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 1 型糖尿病 (T1DM) 组 54 例, 2 型糖尿病 (T2DM) 组 104 例, 健康对照 (CON) 组 102 例, 260 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。结果 校正年龄和 BMI 后, 1 型糖尿病组腰椎、股骨颈骨密度低于对照组 ($P < 0.05$); 2 型糖尿病组与对照组相比, 骨密度差异无显著性 ($P > 0.05$); 甲状旁腺素 (BSTB1 位点) 基因型和等位基因分布频率在 1 型糖尿病组、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 基因型者腰椎 (L₂₋₄) 和股骨颈部位骨密度显著高于 Bb/bb 基因型 ($P < 0.05$); 在 1 型糖尿病组, BB 基因型仅腰椎 L₂₋₄ 部位骨密度高于 Bb/bb 基因型 ($P < 0.05$); 联合 VDR 基因多态 (Apa I 酶切位点) 分析结果表明, Bbaa 基因型在腰椎和股骨颈骨密度低于其他基因型 ($P < 0.05$)。结论 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。联合 VDR 基因多态 (Apa I 酶切位点) 有助于识别糖尿病患者发生骨质疏松的高危人群。

关键词: 甲状旁腺素; 维生素 D 受体; 基因多态性; 骨密度; 糖尿病

Effect of parathyroid hormone and vitamin D receptor gene polymorphisms on bone mineral density in the subjects with diabetes mellitus CHENG Jie, ZHAIMuxu, JIANG Hongwei et al Department of Nephropathy, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001, China

Abstract Objective To evaluate the effect of parathyroid hormone gene polymorphisms on bone mineral density (BMD) and osteopenia/osteoporosis of diabetic patients of indigenous Han of north Chinese. To analyse the influence of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphism on the correlation of PTH gene polymorphism with BMD. **Methods** Diabetic patients (diabetic group) were selected from Endocrinology and Diabetes Hospital of Qingdao between January 1998 and January 2002. The 158 cases with diabetes mellitus including 54 with type 1 diabetes mellitus (T1DM group) and 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** After correcting for age and BMI, Bone mineral density was lower at the lumbar spine and femoral neck in subjects with type 1 diabetes compared with control group ($P < 0.05$), and was still significantly lower than that of control group ($P < 0.05$); BMD was not significantly different in subjects with type 2 diabetes compared with control group ($P > 0.05$). There was no significant difference in the distribution of genotypes and allele frequencies of PTH between the type 1 diabetic, type 2 diabetic and control groups ($P > 0.05$). Subjects with "BB" genotype had higher BMD at lumbar spine and femoral neck

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 (翟木绪、姜宏卫、柳林、董砚虎)

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

than those with "Bb/bb" genotype in control and type 2 diabetic group ($P < 0.05$), respectively. In type 1 diabetic group subjects with "BB" genotype had higher BMD only at the lumbar spine than those with "Bb/bb" genotype ($P < 0.05$). Combined analyse of the association of PTH and VDR gene polymorphisms with osteopenia/osteoporosis showed that subjects with "Bbaa" genotype had significantly lower BMD at femoral neck and lumbar spine than those with other genotypes in diabetic group ($P < 0.05$). **Conclusions** In diabetic patients BST B1 polymorphism of PTH gene would be a useful genetic marker for lower BMD and the susceptibility to osteoporosis. Combined analyse of the association of PTH and VDR gene polymorphisms may provide a tool to identify more precisely diabetic patients at risk of developing osteopenia or osteoporosis.

Key words Parathyroid hormone; Vitamin D receptor; Gene polymorphism; Bone mineral density; Diabetes mellitus

糖尿病性骨质疏松是糖尿病的慢性并发症,遗传因素可能参与了DM骨质疏松的发生和发展^[1]。研究表明甲状旁腺激素(PTH)基因多态性是低骨量及骨质疏松易感性的遗传标志^[2]。我们在研究DM患者维生素D受体(VDR)^[3]基因多态性与BMD关系的基础上,测定DM患者PTH的基因型和BMD,以期了解PTH基因多态与DM性骨量减少及骨质疏松的关系;通过联合分析PTH和VDR基因多态与BMD的相关性,为筛选糖尿病性骨质疏松相对高危人群提供理论依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

糖尿病(DM)组:选择1998年1月~2002年1月在青岛市内分泌糖尿病医院住院的糖尿病患者158例,年龄在20~65岁之间,均为北方汉族人,相互之间无亲缘关系。其中1型糖尿病(T1DM)组54例、2型糖尿病(T2DM)组104例。糖尿病诊断标准参照WHO标准(1999年标准):FBS ≥ 7.0 mmol/L或OGTT 2 hBS ≥ 11.1 mmol/L。所有受检者均无肝、肾慢性疾病,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线片检查,证实腰椎结构适于BMD测量。所有研究对象均知情同意。对照组(CON):按照年龄、性别可比的原则选择102例健康人为对照。所有研究对象均知情同意。

1.2 实验方法

观察临床及生化指标:所有研究对象均询问病史并记录病程;各组试验前禁食12 h以上,空腹抽取静脉血8 ml 2 ml EDTA抗凝血用于抽提基因组DNA,其用于检测血糖、血脂、胰岛素及C肽、HbA_{1c}等临床和生化指标。骨密度测量采用双能X线吸

收法骨密度仪(DEXA)。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'-CAT-TCT-GTG-TAC-TAT-AGT-TG-3'及下游引物5'-GAG-CTT-TGA-ATT-AGCA-3'。反应条件:94℃变性1 min, 55℃退火1 min, 72℃延伸1 min,最后于72℃延伸7 min, 35个循环。PCR产物用限制性内切酶BST BI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。

1.3 统计学处理

PTH基因由于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^2 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、T1DM组和T2DM组骨密度比较

各组病程、FBS、胰岛素及C肽水平、HbA_{1c}、TC、TG、LDL、HDL比较差异无统计学意义($P > 0.05$);校正年龄和BMI后,T1DM组腰椎、股骨颈部位BMD显著低于CON组($P < 0.05$),T2DM组各部位BMD与CON组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表1。

表1 CON组、T1DM组和T2DM组BMD比较(g/cm², $\bar{x} \pm s$)

组别	腰椎 ₂₋₄	股骨颈	大转子	Ward's区
CON	0.947 $\pm$ 0.149	0.913 $\pm$ 0.135	0.813 $\pm$ 0.126	0.775 $\pm$ 0.115
T1DM	0.860 $\pm$ 0.148 [#]	0.842 $\pm$ 0.135 [#]	0.789 $\pm$ 0.134	0.747 $\pm$ 0.123
T2DM	0.948 $\pm$ 0.132	0.928 $\pm$ 0.132	0.874 $\pm$ 0.129	0.801 $\pm$ 0.127

注:与CON组相比,[#] $P < 0.05$

2.2 PTH基因BST B1多态位点酶切电泳结果

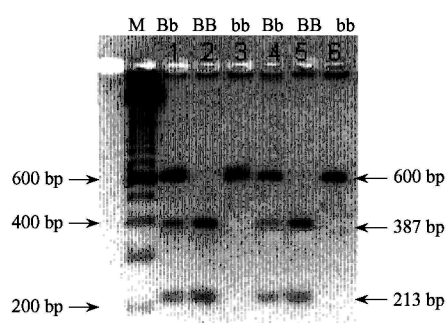


图 1 BstBI限制性内切酶酶切电泳结果

注: BB型为 600 bp Bb型为 600、387和 213 bp bb型为 387和 213 bp

见图 1。

2.3 PTH 基因多态与 BMD 的相关性

2.3.1 CON 组、T1DM 组与 T2DM 组 PTH 基因型分布: CON 组 BB、Bb 及 bb 基因型分别为 82 例、19 例、1 例; T1DM 组中 BB、Bb 基因型分别为 43 例、11 例, 未见 bb 型; T2DM 组中, BB、Bb 及 bb 基因型分别为 86 例、17 例和 1 例, 三组间基因型分布频率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3.2 CON 组、T1DM 组与 T2DM 组 PTH 基因型间 BMD 的比较: 各组病程、FBS、胰岛素及 C 肽水平、HbA_{1c}、TC、TG、LDL、HDL 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 校正年龄和 BMI 后, CON 组和 T2DM 组 BB 基因型者腰椎_{2~4}和股骨颈部位 BMD 高于 Bb/bb 型 ($P < 0.05$); 大转子及 Ward's 区 BMD 值比较差异无显著性 ($P > 0.05$); 在 T1DM 组 BB 基因型者仅腰椎_{2~4}部位 BMD 高于 Bb/bb 型 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 CON 组、T1DM 组与 T2DM 组不同 PTH 基因型间比较 BMD (g/cm^2 , $\bar{x} \pm s$)

组别	腰椎 _{2~4}	股骨颈	大转子	Ward's 区
CON	-	-	-	-
BB	1.036 $\pm$ 0.131 [#]	0.953 $\pm$ 0.124 [#]	0.816 $\pm$ 0.172	0.778 $\pm$ 0.145
Bb/bb	0.933 $\pm$ 0.125	0.858 $\pm$ 0.153	0.764 $\pm$ 0.142	0.757 $\pm$ 0.173
T1DM				
BB	0.968 $\pm$ 0.127 [#]	0.864 $\pm$ 0.132	0.775 $\pm$ 0.124	0.758 $\pm$ 0.121
Bb	0.856 $\pm$ 0.110	0.828 $\pm$ 0.076	0.743 $\pm$ 0.163	0.712 $\pm$ 0.187
T2DM				
BB	1.062 $\pm$ 0.132 [#]	0.962 $\pm$ 0.130 [#]	0.875 $\pm$ 0.107	0.8041 $\pm$ 0.113
Bb/bb	0.945 $\pm$ 0.108	0.881 $\pm$ 0.138	0.836 $\pm$ 0.142	0.785 $\pm$ 0.146

注: 与 Bb/bb 组比较, [#] $P < 0.05$

2.4 PTH 和 VDR 基因多态与 BMD 的相关性

2.4.1 PTH 和 VDR 基因型组分布: 在研究 DM 患

者 VDR 基因多态性与 BMD 关系的基础上^[4], 将 VDR 基因 Apa I 多态位点与 PTH 基因型进行联合分析, 理论上可存在 $3^2 = 9$ 种复合基因型。本研究共对 DM 患者 158 例 (T1DM/T2DM), CON 组 102 例进行联合分析。联合分析结果共发现 7 种基因型组。其中, BBaa 基因型组最为常见, 依次为 BBAa、Bbaa、BBAA、BbAa、BbAA 及 bbaa 等基因型, 未见 bbAA、bbaa 等基因型。DM 患者中共发现 6 种基因型, 依次为 BBaa、BBAa、Bbaa、BBAA、BbAa 及 BbAA 基因型, 未见 bbAA、bbAa 及 bbaa 等基因型。T1DM 组、T1DM 组和 CON 组相比, 组间基因型频率分布差异无显著性 ($P > 0.05$)。

2.4.2 PTH 和 VDR 基因型组间 BMD 的比较: 在 158 例 DM 患者中, 各基因型组病程、FBS、胰岛素及 C 肽水平、HbA_{1c}、TC、TG、LDL、HDL 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。校正年龄和 BMI 后, Bbaa 基因型股骨颈和腰椎部位 BMD 低于其他基因型 ($P < 0.05$)。其余基因型间 BMD 无显著差异 ($P > 0.05$) (见表 3)。

表 3 DM 组不同基因型组间 BMD 比较 (g/cm^2 , $\bar{x} \pm s$)

基因型	腰椎 _{2~4}	股骨颈	大转子	Ward's 区
BBAA	1.052 $\pm$ 0.125	0.904 $\pm$ 0.132	0.878 $\pm$ 0.124	0.775 $\pm$ 0.121
BBAa	1.045 $\pm$ 0.124	0.891 $\pm$ 0.143	0.873 $\pm$ 0.142	0.768 $\pm$ 0.173
BBaa	1.027 $\pm$ 0.134	0.881 $\pm$ 0.124	0.831 $\pm$ 0.173	0.758 $\pm$ 0.154
Bbaa	0.876 $\pm$ 0.108 [#]	0.819 $\pm$ 0.076 [#]	0.8154 $\pm$ 0.164	0.735 $\pm$ 0.186
Others	1.032 $\pm$ 0.136	0.874 $\pm$ 0.130	0.849 $\pm$ 0.105	0.757 $\pm$ 0.125

注: Bbaa 基因型与其他基因型比较, [#] $P < 0.05$

3 讨论

目前 T2DM 性骨质疏松症的发病机制尚未阐明, 遗传因素可能参与了 T2DM 性骨质疏松的发生和发展^[1]。PTH 基因位于 11p15.1~15.3 其第 2 内含子具有限制性内切酶 BstBI 酶切位点。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 等^[2]对 383 名日本绝经后妇女测量 BstBI 基因多态性与 BMD 的关系, 发现 Bb 基因型妇女在腰椎 BMD 和 z 值及全身 BMD 和 z 值明显低于 BB 型妇女, 认为 BstBI 基因多态性对于低骨量及可疑骨质疏松者是一个有用的预测指标。美国 Gong 等^[4]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更密切。李梅等^[5]对北京地区汉族人群研究发现, 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和 BB基因型在腰椎、股骨颈、Ward区及大转子部位 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。Zhou等^[6]对中国 402个核心家庭 1263名成员调查 BstB I基因多态性与 BMD的关系, 发现 PTH 基因多态性与腰椎、髌部骨矿物质含量 (BMC)及 BMD未显示相关性。Zhong等^[7]对 314名正常志愿者女性研究发现, PTH 基因频率在绝经前和绝经后妇女中的分布无显著差异。PTH 基因多态与正常女性的 BMD和血清骨生化指标亦无相关性。

本研究中 CON组 Bb/bb基因型组腰椎和股骨颈 BMD低于 BB型, 与 Zhong等^[7]研究结果不同, 与 Hosoi等^[2]研究结果相似, 考虑可能与样本量、地域差异以及环境等因素有关。本研究发现在 DM人群中 PTH 基因多态与骨密度、骨量减少相关。T2DM患者 Bb基因型对应于较低的腰椎和股骨颈 BMD, T1DM患者 Bb基因型对应于较低的腰椎 BMD, 提示 Bb基因型可能是 DM患者骨量减少/骨质疏松的易感基因型, DM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。

骨质疏松是一种多基因遗传病, 多种基因可以和 BMD相关, 不同基因对骨矿盐代谢的影响可能存在协同或拮抗作用^[8]。通过联合分析若干骨质疏松候选基因, 以确定遗传因素对骨量的影响是目前骨质疏松的研究方向之一。VDR 基因多态与 BMD、骨质疏松关系的揭示始于 Morrison等^[1]的研究, 他首次发现对应于 BsmI、ApaI、TaqI酶切位点的 VDR等位基因与 BMD相关, 其对 BMD的影响可占遗传因素的 75%左右。我们既往研究显示^[3], DM患者 VDR 基因多态 (Apa I酶切位点) 在某些部位与 BMD存在相关性, 对 BMD具有预测价值。

PTH和维生素 D均为调节钙磷代谢和骨重构

的重要激素, PTH和VDR基因多态性对 BMD的影响是协同、拮抗, 亦或无相互作用, 目前尚不清楚。本研究在探讨了 DM患者 PTH基因多态性与 BMD的基础上, 进一步联合分析 VDR基因多态 (Apa I酶切位点) 对 DM患者 BMD的影响, 结果发现与 VDR基因多态联合后, Bbaa基因型在腰椎和股骨颈部位 BMD低于其他基因型 ($P < 0.05$), 提示联合分析 PTH和VDR基因型有助于更精确的识别 DM患者合并低骨量、骨质疏松的高危人群, 对 DM性骨质疏松的早期防治具有重要的理论价值和实用价值。

【参考文献】

- [1] Morrison NA, Yeaman R, Kelly PJ et al Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992; 89: 6665.
- [2] 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.
- [3] 董砚虎, 翟木绪, 李长贵, 等. 糖尿病维生素 D受体基因多态性与骨密度相关性研究. *中华内分泌代谢杂志*, 2002; 18: 111-115.
- [4] 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.
- [5] 李梅, 孟迅吾. 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; 2(23): 45-48.
- [6] Zhou XG, Liu YZ, Li MX, et al Parathyroid hormone gene with bone phenotype in Chinese. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003; 307: 666-671.
- [7] 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.
- [8] 孟迅吾. 全方位地关注原发性骨质疏松症的研究. *中华内分泌代谢杂志*, 2000; 16(4): 201-202.

(收稿日期: 2009-10-11)