

• 论著 •

维生素 D 受体基因 Apa I 多态性与绝经后妇女骨密度的关系

葛继荣 陈可 谢丽华 薛莲 李生强

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2010)10-0719-04

摘要: 目的 了解福州地区绝经后妇女维生素 D 受体基因 Apa I 多态性的分布,探讨维生素 D 受体基因 Apa 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 L₂₋₄、股骨颈、大转子和 Ward 三角区骨密度,应用 PCR-RFLP 技术检测维生素 D 受体基因 Apa I 多态性。结果 ①维生素 D 受体基因型分布频率为 AA 型 10.1%, aa 型 46.6%, Aa 型 43.2%。等位基因频率为 A 31.8%, a 68.2%, 基因型分布符合 Hardy-Weinberg 定律。②骨质疏松组与对照组基因型及等位基因分布频率差异均无显著性。③分析其基因型与骨密度的关系:AA、aa、Aa 3 种基因型在腰椎、股骨颈、大转子、Ward 区 4 个部位骨密度均无显著性差异。结论 维生素 D 受体基因 Apa 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; 遗传多态性

The relationship between ApaI polymorphism of VDR gene and bone mineral density in postmenopausal women GE Jirong, CHEN Ke, XIE Lihua, et al. Fujian Institute of Chinese Medicine, Fuzhou 350003, China

Corresponding author: GE Jirong, Email: gjrrjgcy@sohu.com

Abstract: Objective To investigate the distribution of ApaI polymorphism of vitamin D receptor (VDR) gene in Fuzhou postmenopausal women and to explore the relationship between ApaI polymorphism of VDR gene and bone mineral density (BMD) in postmenopausal women. **Methods** BMDs of the lumbar vertebral L₂₋₄, the femoral neck, the trochanter, and Ward's triangle area in 592 postmenopausal women were measured using dual energy X-ray absorptiometry. The ApaI polymorphism of VDR gene was determined by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). **Results** 1) The distribution frequencies of VDR genotypes AA, aa, and Aa were 10.1%, 46.6%, and 43.2%, respectively. The frequencies of allelic gene A and a were 31.8% and 68.2%. The distribution of VDR genotype followed the Hardy-Weinberg equilibrium. 2) There is no significant difference of genotype or frequencies of allele distribution between osteoporosis group and control group. 3) The analysis of the relationship between the VDR genotypes and BMD showed no significant difference between the genotypes AA, aa, or Aa and BMDs of the lumbar spine, the femoral neck, the trochanter and Ward's triangle. **Conclusion** ApaI gene polymorphism of VDR is not correlated with BMD and could not be considered to be a genetic marker to predict the risk of developing osteoporosis in postmenopausal females in Fuzhou.

Key words: Postmenopausal women; Bone mineral density; Vitamin D receptor; Genetic polymorphism

骨质疏松症是一种受多基因调控的骨代谢性疾病。维生素 D 是调节骨代谢的最重要激素之一,维

生素 D 通过其受体调节肠钙吸收和骨代谢。Morrison 等^[1]首先报道维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)基因 Bsm I 多态性与骨密度相关,但 Bsm I 多态性 BB 基因型在中国汉族人群中罕见^[2],而 Apa I 和 Bsm I 酶切位点均位于第 8 内含子上,故本研究选择 Apa I 多态性,以福州地区绝经后妇女为研究对象,研究该群体 Apa I 基因多态性与骨

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国家药物临床试验机构

通讯作者: 葛继荣, Email: gjrrjgcy@sohu.com

密度 (bone mineral density, BMD) 之间的相关性, 为筛选骨质疏松高危人群提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 对象

从福州地区常住汉族人口中随机筛选无亲缘关系绝经后妇女 623 例, 剔除 31 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/m², 平均 (23.91 ± 3.18) kg/m²; 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^[3]; 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), 精密度: < 1%, 质控后变异系数: 0.71%; 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'^[4]; 限制性内切酶 Apa 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 (L₂₋₄)、左侧股骨颈、大转子和 Ward 三角区的骨密度。

1.4 维生素 D 受体基因 Apa 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, ddH₂O 15 μL, 引物各 2.5 μL (浓度 10 pmol/L), DNA 250 ng; 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。Apa I 酶切条件: 扩增产物 5 μL, Apa I 内切酶 2 μL (浓度 8 ~ 20 U/μL), 10×PCR 缓冲液 2 μL, 蒸馏水 11 μL, 混匀置 37℃ 水浴过夜。取反应产物 10 μL, 浓度为 1.8% 琼脂糖凝胶电泳半小时, EB 染色。Apa I 基因型判断: AA 型 (740 bp), Aa 型 (740 bp, 515 bp, 225 bp), aa 型 (515 bp, 225 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 $\bar{x} \pm s$ 表示, SPSS13.0 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 Apa I 多态性检测结果

592 例 VDR 基因型分布频率为 AA 型 60 例 (10.1%), aa 型 276 例 (46.6%), Aa 型 256 例 (43.2%); 等位基因频率为 A 31.8%、a 68.2%, 经统计学处理, 基因频率分布符合 Hardy-Weinberg 定律。

2.2 不同人群 VDR 基因 Apa I 基因频率分布 (见表 1)

表 1 不同人群 VDR 基因 Apa 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
		AA	Aa	aa	A	a	
福州地区	592	10.1	43.2	46.6	31.8	68.2	本研究
北京地区	110	2.7	43.6	53.7	24.5	75.5	章振林 ^[2]
北京地区	115	3.5	41.7	54.8	24.3	75.7	赵金秀 ^[5]
山东 (50 ~ 80 岁) ※	143	7.7	26.6	65.7	21.0	79.0	陈占文 ^[6]
智利 (65 ~ 94 岁) #	126	30.0	46.0	14.0	57.0	43.0	Quevedo ^[7]
上海 (19 ~ 40 岁)	515	5.8	41.9	52.3	26.8	73.2	何进卫 ^[8]
日本 (绝经前)	488	8.6	48.2	43.2	29.0	71.0	Tokita ^[9]
高加索 (绝经前) #	518	25.7	51.5	22.8	52.0	48.0	Tokita

注: 与本研究比较, # $P < 0.01$; ※ $P < 0.05$

2.3 骨质疏松组与正常组等位基因频率比较

骨质疏松组与对照组 AA、Aa、aa 基因型分布频率差异无显著性 ($P > 0.05$), 骨质疏松组与对照组 A 和 a 等位基因分布频率差异也无显著性 ($P > 0.05$) (表 2)。

表 2 骨质疏松组与对照组等位基因频率比较

组别	基因型 (%)			等位基因 (%)	
	AA	Aa	aa	A	a
骨质疏松组	37 (10.0)	163 (43.9)	171 (46.1)	237 (31.9)	505 (68.1)
对照组	23 (10.4)	93 (42.1)	105 (47.5)	139 (31.4)	303 (68.6)

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

为了排除年龄、绝经年限、身高、体重及体质指数对骨密度的影响, 在比较 3 组基因型骨密度之前, 我们比较 AA、Aa 与 aa 型的年龄、绝经年限、身高、体重及体质指数, 结果均无明显差异 ($P > 0.05$), 说明 3 组基因型的年龄、绝经年限、身高、体重及体质指数具有可比性。AA 型、Aa 型和 aa 型

3 组基因型和各部位骨密度关系见表 3。AA 型、Aa 型和 aa 型 3 组基因型在第 2-4 腰椎、股骨颈、大转子、Ward 三角区各部位的骨密度均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 3 维生素 D 受体基因 Apa I 基因型的临床特征 ($\bar{x} \pm s$)

项目	AA	Aa	aa
例数	60	256	276
年龄 (岁)	63.03 $\pm$ 6.428	62.52 $\pm$ 6.387	61.71 $\pm$ 6.215
绝经年限 (年)	13.22 $\pm$ 7.632	13.32 $\pm$ 7.466	12.57 $\pm$ 7.205
身高 (cm)	154.7 $\pm$ 5.100	155.7 $\pm$ 5.100	155.9 $\pm$ 5.140
体重 (kg)	57.87 $\pm$ 8.068	58.44 $\pm$ 8.779	57.68 $\pm$ 8.641
体质指数 (BMI)	24.187 $\pm$ 3.288	24.077 $\pm$ 3.207	23.702 $\pm$ 3.123
L ₂₋₄ (腰椎 ₂₋₄)	0.763 $\pm$ 0.128	0.768 $\pm$ 0.129	0.755 $\pm$ 0.116
BMD Neck (股骨颈)	0.809 $\pm$ 0.126	0.808 $\pm$ 0.118	0.815 $\pm$ 0.117
(g/cm ²) Troch (大转子)	0.787 $\pm$ 0.126	0.788 $\pm$ 0.121	0.778 $\pm$ 0.113
Ward (Ward 三角)	0.649 $\pm$ 0.142	0.652 $\pm$ 0.142	0.648 $\pm$ 0.131

3 讨论

骨质疏松是老年人常见的疾病之一,影响到世界各地 150 多万人的健康,主要是绝经后妇女。流行病学研究表明,遗传因素可能参与 80% ~ 90% 骨密度改变,因此关系到发生骨质疏松的风险。维生素 D 受体 (VDR) 基因已被广泛研究,但它与骨质疏松的关系一直有争议^[10]。VDR 基因位于 12 号染色体 (12q13.1),长度超过 100 kb^[11],由 9 个外显子和 8 个内含子组成。Apa I 酶切位点位于 VDR 基因第 8 个内含子,酶切位点为 GGGCCC,没有酶切位点时序列为 GTGCCC。VDR 基因 Apa I 多态性并不影响 VDR 的氨基酸序列,但其与不同地区或国家妇女 BMD 的关系研究结果却不尽相同。

本研究通过分析 592 例福州地区绝经后妇女 VDR 基因 Apa I 多态性,显示 AA、Aa 和 aa 基因型频率分别为 10.1%、43.2%、46.6%,A、a 等位基因频率分别为 31.8%、68.2%,与日本绝经前妇女^[9]、章振林等^[2]、赵金秀等^[5]、何进卫等^[8]的研究报道相似。但与陈占文等^[6]的研究结果有差异,与国外其他地区人种则有显著性差异。智利老年妇女 AA、Aa 和 aa 基因型频率分别为 30.0%、46.0%、14.0%^[7],高加索绝经前妇女 AA、Aa 和 aa 基因型频率分别为 25.7%、51.5%、22.8%^[9]。汉族人与日本人同属于蒙古人种,有别于高加索人种,而智利是属于蒙古人种印第安类型,可见,VDR 基因 Apa I 多态性是存在显著的种族差别,而饮食、生活习惯

等环境因素对遗传因素的影响可能使同一人种的基因频率产生不同,这也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 VDR 基因 Apa I 位点多态性与绝经后妇女骨密度的关系,本研究结果 VDR 基因 Apa I 多态性与各部位骨密度无明显关联,提示 Apa I 多态性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。这与部分国内外研究结果是相一致的。芬兰^[12]研究提示绝经后妇女 VDR 基因 Apa I 多态性对 BMD 没有影响。Jaramillo 等^[13]也未发现墨西哥女性各部位骨密度与 Apa I 基因型相关。Kung 等^[14]的研究发现 VDR 基因 Apa I 多态性与香港地区绝经前妇女腰椎和股骨近端 BMD 值无关。秦跃娟等^[15]研究提示 VDR 基因 Apa I 多态性与上海女性峰值 BMD 值变异无关联和连锁,不是上海汉族女性峰值 BMD 值变异的数量性状位点。但也有结论不同的报道:赵金秀等^[16]研究表明北京地区汉族绝经后妇女 aa 型者腰椎骨密度显著低于 Aa 型。Dundar 等^[17]研究 136 例绝经后妇女,发现绝经后妇女腰椎骨密度 aa 基因型显著低于 AA 基因型。朝鲜^[18]和西班牙^[19]的研究也都表明绝经后妇女 VDR 基因 Apa I 多态性与 BMD 相关联。对病例对照研究方面,本研究未发现骨质疏松组与对照组 Apa I 基因型和等位基因分布频率有差异。Ensrud 等^[20]对美国明尼苏达州 9704 例 65 岁以上女性的前瞻性病例对照研究表明,髌部、椎体或其他部位骨折病例与相应对照组之间的 Apa I 基因型分布差异均无显著性。Quevedo 等^[7]发现在骨折、无骨折妇女中 Apa I 基因型和等位基因分布频率没有差异,提示 VDR 基因多态性与智利南部地区老年妇女的髌部骨折危险无关。但北京、武汉、福建 3 地共 477 例单核苷酸多态性研究却显示骨质疏松组 Apa I 基因型分布与对照组之间有显著性差异,骨质疏松组 aa 型所占比例显著高于对照组^[21]。陈占文等^[6]研究报道山东半岛地区女性及 ≥ 65 岁骨质疏松组同相应对照组相比差异有显著性, ≥ 65 岁骨质疏松组 aa 基因型与 a 等位基因频率高于其对照组。

我们分析:以上有关 VDR 基因 Apa I 位点多态性与骨密度、骨质疏松症的相关性研究的结果不一致,除可能与种族差异、生活环境、样本大小等有关;还由于骨质疏松症是多基因复杂病,研究单个基因对其的影响是有局限性的,基因——基因及基因——环境之间可能存在协同作用,因此需要多个基因、多个多态位点及环境因素等多方面结合深入

探索骨质疏松的遗传基础。总之,本研究表明维生素 D 受体基因 Apa 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。

【参 考 文 献】

- [1] Morrison NA, Qi JC, Tokita A, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor gene alleles. *Nature*, 1991, 367: 284-287.
- [2] 章振林, 赵金秀, 孟迅吾, 等. 维生素 D 受体基因起始密码子和 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.
- [3] 刘忠厚, 扬定焯, 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, 6(1): 1-3.
- [4] Uysal A R, Sahin M, Gürsoy A, et al. Vitamin D receptor gene polymorphism and osteoporosis in the Turkish population. *Genet Test*, 2008, 12(4): 591-594.
- [5] 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.
- [6] 陈占文, 陈晓亮, 王德春, 等. 维生素 D 受体基因 Apa I 多态性与骨质疏松症相关性的研究. *中国骨质疏松杂志*, 2007, 13(6): 402-405.
- [7] Quevedo LI, Martinez 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): 475-81.
- [8] 何进卫, 黄琪仁, 章振林, 等. 雌激素受体 α 和维生素 D 受体基因多态性与上海市妇女峰值骨量的关系. *中华内分泌代谢杂志*, 2004, 20(2): 140-142.
- [9] Tokita A, Matsumoto H, Morrison NA, et al. Vitamin D receptor alleles, bone mineral density and turnover in premenopausal Japanese women. *J Bone Miner Res*, 1996, 11: 1003-1009.
- [10] Zambrano-Morales M, Borjas L, Fernández E, et al. Association of the vitamin D receptor gene BBAAtt haplotype with osteoporosis in post-menopausal women. *Invest*, 2008, 49(1): 29-38.
- [11] Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, et al. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*, 2004, 338(2): 143-156.
- [12] Välimäki S, Tähmelä R, Kainulainen K, et al. Relation of collagen type 1 alpha 1 (COL1A 1) and vitamin D receptor genotypes to bone mass, turnover, and fractures in early postmenopausal women and to hip fractures in elderly people. *Eur J Intern Med*, 2001, 12(1): 48-56.
- [13] 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.
- [14] Kung AW, Yeung SS, Lau KS. Vitamin D receptor gene polymorphism and peak bone mass in southern Chinese women. *Bone*, 1998, 22: 389-393.
- [15] 秦跃娟, 章振林, 黄琪仁, 等. 维生素 D 受体基因 Apa I 多态性与核心家庭女性峰值骨密度关系研究. *中国骨质疏松杂志*, 2006, 12(1): 4-7.
- [16] Zhao J, Zhou X, Meng X, et al. Polymorphisms of vitamin D receptor gene and its association with bone mineral density and osteocalcin in Chinese. *Chin Med J (Engl)*, 1997, 110(5): 366-371.
- [17] Dundar U, Solak M, Kavuncu V, et al. Evidence of association of vitamin D receptor Apa I gene polymorphism with bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *Clin Rheumatol*, 2009, 28(10): 1187-1191.
- [18] Choi YM, Jun JK, Choe J, et al. Association of the vitamin D receptor start codon polymorphism (Fok I) with bone mineral density in postmenopausal Korean women. *J Hum Genet*, 2000, 45: 280-283.
- [19] Gomez C, Naves M L, Barrios Y, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms, bone mass, bone loss and prevalence of vertebral fracture: differences in postmenopausal women and men. *Osteoporos Int*, 1999, 10: 175-182.
- [20] Ensrud KE, Stone K, Cauley JA, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms and the risk of fractures in older women. *J Bone Miner Res*, 1999, 14(10): 1637-1645.
- [21] 谢雁鸣, 胡松年, 韩华, 等. 北京、武汉、福建原发性骨质疏松症 VDR I, VDR II-1, VDR II-2 基因单核苷酸多态性研究. *中国骨质疏松杂志*, 2005, 11(1): 54-57.

(收稿日期: 2010-05-28)