

• 论 著 •

降钙素受体基因 *Alu I* 多态性与绝经后妇女骨密度的关系

葛继荣 谢丽华 陈可 曾雪爱 赖玉链 薛莲

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2010)11-0829-04

摘要: 目的 观察降钙素受体基因 *Alu I* 多态性与绝经后妇女骨密度及骨转换生化标志物的关系。方法 ①2007-01/2008-12 从福州常住汉族人中随机检测绝经后妇女 623 例,均知情同意。②记录年龄、绝经年限、体质量指数和绝经后骨折情况。③双能 X 线骨密度仪检测正位第 2~4 腰椎、左侧股骨颈、大转子和 Ward's 三角区骨密度。④PCR-RFLP 技术检测降钙素受体基因 *Alu I* 多态性。⑤用酶联免疫吸附法检测骨转换生化标志物(血清骨钙素、血清骨碱性磷酸酶、尿吡啶啉和尿脱氧吡啶啉)。结果 591 例合格受试者进入结果分析,年龄 48~84 岁,平均 62.19 ± 6.32 岁。①降钙素受体基因 *Alu I* 多态性各基因型间骨密度比较差异不显著($P > 0.05$)。②降钙素受体基因 *Alu I* 多态性各基因型间血清骨钙素、血清骨碱性磷酸酶和尿脱氧吡啶啉比较差异不显著($P > 0.05$),TT 型尿吡啶啉明显低于 CC 型、TC 型,组间比较差异显著($P < 0.05$)。③降钙素受体基因 *Alu I* 多态性各基因型间骨质疏松症例数比较差异不显著($P > 0.05$)。④降钙素受体基因 *Alu I* 多态性各基因型间绝经后骨折比较差异不显著($P > 0.05$)。结论 降钙素受体基因 *Alu I* 多态性与绝经后骨质疏松症无明显关联,不能作为福州地区绝经后妇女骨质疏松的遗传标记。

关键词: 绝经后骨质疏松症; 多态现象; 降钙素受体; 骨转换生化标志物; 骨折

Association between the *Alu I* polymorphism in the calcitonin receptor gene and bone mineral density in postmenopausal women GE Jirong, XIE Lihua, CHEN Ke, et al. Department of Orthopaedics, Fujian Academy of Chinese Medicine, Fuzhou 350003, China

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

Abstract: Objective To study the association between the calcitonin receptor gene *Alu I* genetic polymorphism and bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women.

Methods ①Six hundred and twenty-three postmenopausal Han ethnic women in Fuzhou city were randomly selected from January 2007 to December 2008. They all signed the consent form. ②Age, menopause duration, body mineral index and postmenopausal fracture were recorded. ③Bone mineral densities of lumbar vertebrae 2-4, left femoral neck, the greater trochanter, and Ward's triangle zone were measured with dual energy X-ray absorptiometry. ④The polymorphic regions were amplified using PCR followed by digestion with restriction enzymes *Alu I*, and analyzed electrophoretically. ⑤The biochemical markers of bone turnover including serum bone gla protein, bone alkaline phosphatase, urinary pyridinoline, and urinary deoxypyridinoline were detected with enzyme linked immunosorbent assays. **Results** Totally 591 cases, aged from 48 to 84, 62.19 ± 6.32 years in average, were qualified for the analysis. ①There were no significant differences in bone mineral density among genotypes of *Alu I* polymorphism sites ($P > 0.05$). ②There were no significant differences in serum bone gla protein, bone alkaline phosphatase and urinary deoxypyridinoline among genotypes of *Alu I* polymorphism sites ($P > 0.05$). Urinary pyridinoline was lower in TT genotype group than that in CC and TC genotype group ($P < 0.05$). ③There were no significant

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骨科

通讯作者: 葛继荣, Email: gjrrjgcy@sohu.com

differences in the incidence of osteoporosis among genotypes of *Alu I* polymorphism sites ($P > 0.05$). ④

There were no significant differences in the incidence of postmenopausal fracture among genotypes of *Alu I* polymorphism sites ($P > 0.05$). **Conclusions** *Alu I* polymorphism of the calcitonin receptor gene was not associated with postmenopausal osteoporosis and it could not be regarded as genetic markers of osteoporosis in Fuzhou postmenopausal women.

Key words: Postmenopausal osteoporosis; Polymorphism; Calcitonin receptor; Biochemical markers of bone turnover; Fracture

自 1968 年首次从猪甲状腺分离纯降钙素后,人类对降钙素的认识日趋深刻。降钙素是一种调节钙磷代谢的激素,由甲状腺中滤泡旁细胞分泌,其作用能够抑制骨吸收,促进骨形成。由于这种生理作用的存在,近年来科学工作者通过研究降钙素受体 (Calcitonin Receptor, CTR) 基因多态性与骨密度之间的关系,试图找到能够作为骨质疏松遗传标记的基因,但由于种族、地域等因素的差异,临床报道多不一致。如何正确判断 CTR 基因多态性与某地区人群的骨质疏松是否存在关联,作者认为可从骨密度、骨质疏松症和骨折发生率及骨转换生化标志物等方面入手,综合分析 CTR 基因多态性与它们的关系,从而得出其是否与骨质疏松关联的可靠结论。鉴于此,作者开展此方面的研究,结果如下。

1 对象和方法

1.1 研究对象

选择 2007-01/2008-12 从福州鼓楼、晋安、仓山、台江 4 个区的常住汉族人中随机检测绝经后妇女 623 例,剔除 32 例,合格受试者 591 例。年龄 48 ~ 84 岁,平均 62.19 ± 6.32 岁;绝经年限 1 ~ 37 年,平均 12.94 ± 7.35 年;体质指数 $12.50 \sim 38.27 \text{ kg/m}^2$,平均 $23.91 \pm 3.18 \text{ kg/m}^2$;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^[1];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和未完成试验者。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

DNA 试剂盒(杭州博日科技有限公司); $2 \times \text{Taq Plus PCR Master Mix}$ (天根生化科技有限公司);限制性内切酶(宝生物工程(大连)有限公司),引物(上海生工生物工程有限公司),*Alu I* 引物序列: $P_1: 5'-\text{CTC AGT GAT CAC GAT ACT GTG}-3'$, $P_2: 5'-\text{TTC AGT GGA ACC AGC GTT GG}-3'$ 。血清骨碱性磷酸酶、血清骨钙素、尿吡啶啉和尿脱氧吡啶啉试剂盒(美国 Adlitteram Diagnostic Laboratories);双能 X 射线骨密

度仪(OSTEOCORE 型,法国 Medilink 公司,精密度: $< 1\%$,质控后变异系数:0.71%)。

1.3 方法

1.3.1 骨密度检测:用双能 X 线骨密度仪检测正位第 2 ~ 4 腰椎、左侧股骨颈、大转子和 Ward's 三角区骨密度(g/cm^2)。记录年龄、绝经年限、体质指数和绝经后骨折情况。

1.3.2 检测 CTR 基因 *Alu I* 多态性:空腹静脉取血样,ACD 抗凝,用 DNA 试剂盒从白细胞中提取 DNA。PCR 扩增:反应体系 Master Mix $25 \mu\text{l}$, ddH_2O $15 \mu\text{l}$,引物各 $2.5 \mu\text{l}$,DNA $5 \mu\text{l}$;反应条件:94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 45 s,57℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 40 s,35 次循环,最后 72℃ 延伸 10 min。以内切酶 *Alu I* $1 \mu\text{l}$ 消化,37℃ 水浴 2 h,消化物用 9% 聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染,判定基因类型 CC 型(228 bp)、TC 型(228 bp、120 bp、108 bp)、TT 型(120 bp、108 bp)。

1.3.3 检测骨转换生化标志物:晨第一次尿样,用酶联免疫吸附法检测骨转换生化标志物(血清骨碱性磷酸酶、血清骨钙素、尿吡啶啉和尿脱氧吡啶啉)。

1.3.4 统计学分析:计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 描述,非正态分布用 Wilcoxon 秩和检验,频数比较用卡方检验,双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。统计学处理采用 SPSS 13.0 软件完成。

2 结果

2.1 CTR 基因 *Alu I* 基因型分布及其与绝经后妇女骨密度的关系

CTR 基因 *Alu I* 基因频率分布:CC 型 422 例(71.40%)、TT 型 17 例(2.88%)、TC 型 152 例(25.72%),符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡规律。*Alu I* 基因型间 4 个部位骨密度差异均不显著($P > 0.05$),说明 CTR 基因 *Alu I* 多态性与福州地区绝经后妇女骨密度无相关性。见表 1。

表 1 CTR 基因 *Alu* I 基因型间骨密度比较 ($\bar{x} \pm sd$ g/cm²)

基因型	L ₂₋₄ (n)	股骨颈 (n)	大转子 (n)	Ward's 三角 (n)
CC	0.759 ± 0.125 (422)	0.807 ± 0.119 (420)	0.780 ± 0.114 (420)	0.644 ± 0.137 (420)
TT	0.765 ± 0.122 (17)	0.809 ± 0.105 (17)	0.787 ± 0.140 (17)	0.655 ± 0.152 (17)
TC	0.766 ± 0.119 (151)	0.821 ± 0.120 (152)	0.790 ± 0.125 (152)	0.664 ± 0.136 (152)

2.2 CTR 基因 *Alu* I 多态性与绝经后妇女骨转换生化标志物的关系

Alu I 基因型间血清骨碱性磷酸酶、血清骨钙素和尿脱氧吡啶啉比较差异不显著 ($P > 0.05$), TT 型

尿吡啶啉明显低于 CC 型、TC 型, 组间比较差异显著 ($P < 0.05$), 说明 CTR 基因 *Alu* I 多态性与绝经后妇女血清骨碱性磷酸酶、血清骨钙素和尿脱氧吡啶啉无显著的相关性。见表 2。

表 2 CTR 基因 *Alu* I 基因型间骨转换生化标志物比较

基因型	骨钙素 (ng/ml) (n)	骨碱性磷酸酶 (ng/ml) (n)	尿吡啶啉 (nmol/l) (n)	尿脱氧吡啶啉 (nmol/l) (n)
CC	4.19 ± 4.39 (415)	10.20 ± 8.34 (388)	43.80 ± 30.85# (410)	13.43 ± 7.84 (403)
TT	3.66 ± 2.80 (17)	10.59 ± 7.31 (16)	33.46 ± 34.30 (17)	14.67 ± 6.01 (16)
TC	4.51 ± 4.34 (146)	10.25 ± 7.48 (136)	47.74 ± 32.77* (147)	14.18 ± 7.16 (143)

注: 经 Wilcoxon 秩和检验, #: CC 型与 TT 型比较, $Z = -2.044, P = 0.041$; *: TC 型与 TT 型比较, $Z = -2.206, P = 0.027$ 。

2.3 绝经后妇女 CTR 基因 *Alu* I 多态性各基因型间骨质疏松症、绝经后骨折比较

在 591 例绝经后妇女中, 发生骨质疏松症 371 例, 占 62.77%, 未发生骨质疏松症 220 例, 占 37.22%, 经卡方检验, 三基因型间发生骨质疏松症比较差异不显著 ($P > 0.05$); 发生绝经后骨折者 187 例, 占 31.64%, 未发生绝经后骨折者 404 例, 占 68.36%, 经卡方检验, 三基因型间绝经后骨折比较差异不显著 ($P > 0.05$), 说明绝经后妇女 CTR 基因 *Alu* I 多态性均与骨质疏松症、绝经后骨折无相关性。见表 3。

表 3 CTR 基因 *Alu* I 基因型间骨质疏松症、绝经后骨折比较

基因型	骨质疏松症		骨折	
	有	无	有	无
CC	275	147	51	371
TT	10	7	3	14
TC	86	66	133	19

3 讨论

降钙素是一种由 32 个氨基酸构成的单链肽类激素, 分子量是 3419, 其家族有两种受体即 CTR 和 CTR 样受体。CTR 主要存在于骨、肾、脑、外周血淋巴细胞及某些肿瘤组织中, 分子质量是 85 - 90ku, 主要位于破骨细胞膜, 它属于 7 - 跨膜 G 蛋白耦连受体中的一种。人类 CTR 基因位于染色体 7q21.3 上, 长约 4.2kb, CTR 基因的 cDNA 编码产生一种由 490 个氨基酸残基组成的蛋白质。在 CTR 基因的 1377 位点上存在多态性, 产生 CC、TT、TC 亚型。

关于 CTR 基因 *Alu* I 多态性与骨质疏松的关系, 国内外研究报道众说纷纭。Masi 等^[2]报道意大利绝经后妇女 CTR 基因多态性分布: CC 型 10.9%、TC 型 49.7%、TT 型 39.3%, TT 型腰椎骨密度明显低于 CC 型。Bandres 等^[3]报道西班牙绝经后妇女 CTR 基因多态性与骨密度存在相关性。Dreus 等^[4]报道波兰绝经后妇女 CTR 基因频率 CC 型、TC 型、TT 型分别为 8.6%、45.3%、46.1%, TC 型有较高的骨密度, 认为 CTR 基因多态性与骨质疏松可能存在关联。Tsai 等^[5]报道台湾绝经后妇女 CTR 基因多态性 TT 型占 2.4%, TC 型占 22.2%, CC 型占 75.4%, 并得出 TT 型与低骨量有关。赵红燕等^[6]报道 CTR 基因多态性与上海地区绝经后妇女骨密度的关系: CC 型股骨颈骨密度明显高于 TC 和 TT 型, 但在绝经前妇女组不同基因型的骨密度比较无差别, 认为 CTR 基因型与绝经后妇女股骨颈骨密度相关, CTR 基因多态性与绝经后妇女骨密度存在关联。而李东风等^[7]报道 CTR 基因多态性与广州地区绝经后妇女骨密度无关联。章振林等^[8]报道 CTR 基因多态性与北京地区绝经后妇女骨密度无关联。王秀艳等^[9]报道 CTR 基因多态性与安徽地区绝经后妇女骨密度也无关联。作者从绝经后妇女的骨密度、骨质疏松症发生、绝经后骨折发生和骨转换生化标志物水平 (血清骨碱性磷酸酶、血清骨钙素、尿吡啶啉和尿脱氧吡啶啉) 四个方面进行综合分析 CTR 基因多态性与骨质疏松的关系, 虽然 TT 型尿吡啶啉明显低于 CC 型、TC 型, 组间比较差异显著 ($P < 0.05$), 但 CTR 基因多态性基因型间的血

清骨碱性磷酸酶、血清骨钙素和尿脱氧吡啶啉比较均无明显差异,加之 CTR 基因多态性与骨密度、骨质疏松症发生及绝经后骨折发生均无关联,因此,作者认为:CTR 基因 *Alu* I 多态性与绝经后骨质疏松症无明显的关联,它尚不能作为福州地区绝经后妇女骨质疏松的遗传标记。

简而言之,尽管上述研究结果存在不一致,但考虑骨质疏松症是一种多基因调控的疾病^[10,11],单一基因的作用可能比较微效,加之其发生又与环境因素密切相关,因此,寻找放之四海而皆准的某个骨质疏松易感基因可能是很困难的,结合前期作者对其他基因多态性与骨质疏松的关系的研究结果^[12,13],作者认为构建地域性的多基因联合判断体系具有实际意义,这种判断体系可能因地区、人种的不同而存在区别。

【参 考 文 献】

- [1] 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.
- [2] Masi L, Bechenrini L, Gennari L, et al. Allelic variants of human calcitonin receptor distribution and association with bone mass in postmenopausal women. *Bioch Biophys Res Commun*, 1998,245(2):622-626.
- [3] Bandres E, Pombo I, Gonzalez-Huarriz M, et al. Association between bone mineral density and polymorphisms of the VDR, ERalpha, COL1A1 and CTR genes in Spanish postmenopausal women. *J Endocrinol Invest*, 2005,28(4):312-321.
- [4] Drews K, Seremak-Mrozikiewicz A, Bartkowiak-Wieczorek J, et al. Genetic polymorphism of the calcitonin receptor gene and bone mineral density in Polish population of postmenopausal women. *Ginekof Pof*, 2005,76(8):612-618.
- [5] Tsai FJ, Chen WC, Chen HY, et al. The ALUI calcitonin receptor gene polymorphism (TT) is associated with low bone mineral density and susceptibility to osteoporosis in postmenopausal women. *Gynecol Obstet Invest*, 2003,55(2):82-87.
- [6] 赵红燕,刘建民,宁光,等. 降钙素受体基因多态性与上海地区妇女骨密度的关系. 中国医学科学院学报, 2003,25(3):258-261.
- [7] 李东风,吴文,蔡雪珍,等. 降钙素受体基因多态性与广州地区绝经后妇女骨密度关系研究. 华南预防医学, 2005,31(6):12-14,19.
- [8] 章振林,孟迅吾,周学瀛,等. 北京地区汉族妇女维生素 D 受体基因和降钙素受体基因多态性与骨密度的关系. 中华内分泌代谢杂志, 2002,18(2):90-94.
- [9] 王秀艳,邵宜波,章秋,等. 降钙素受体基因多态性与安徽地区绝经后妇女骨密度的关系. 安徽医科大学学报, 2008,43(1):82-84.
- [10] Kanis JA, Melton JM III, Christiansen C, et al. The Diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 1994;9(8):1137-1141.
- [11] Pocock NA, Eisman JA, Hopper JL, et al. Genetic determinants of bone mass in adults. *J Clin Invest*, 1987;80(9):706-710.
- [12] 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化生化标志物的关系. 中国组织工程研究与临床康复, 2009,13(28):5593-5596.
- [13] 葛继荣,李生强,陈可,等. 雌激素受体和骨钙素基因多态性位点联合 P_{Xh} 单倍型对绝经后妇女骨密度的影响. 中华老年医学杂志, 2009,28(3):205-209.

(收稿日期: 2010-07-12)