

老年男性髋部骨折患者 ER α 基因多态性的病例对照研究

王长海¹ 栗平² 马志新² 毕力夫²

中图分类号: R683.42 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2012)03-0210-04

摘要: **目的** 研究呼和浩特地区汉族老年男性髋部骨折患者雌激素受体基因多态性与骨质疏松症的关系。**方法** 收集老年男性髋部骨质疏松性骨折128例,按年龄配比选取汉族男性健康体检者128名,进行病例对照研究。所有受试者均行骨密度检查,并进行雌激素受体基因多态性检测。**结果** 骨质疏松组雌激素受体 Pvu II 基因型 PP、Pp 及 pp 频率分别为 7.8%, 42.2% 和 50.0%;对照组雌激素受体 Pvu II 基因型 PP、Pp 及 pp 频率分别为 13.3%, 53.9% 和 32.8%,卡方检验提示,骨质疏松组和对照组之间 Pp, pp, PP 三种基因型的频率分布差异有显著性意义($P < 0.05$)。骨质疏松组雌激素受体 Xba I 基因型 XX、Xx 及 xx 频率分别为 4.7%, 44.5% 和 50.8%;对照组雌激素受体 Pvu II 基因型 XX、Xx 及 xx 频率分别为 3.1%, 39.1% 和 57.8%,卡方检验提示,骨质疏松组和对照组之间 XX、Xx 及 xx 三种基因型的频率分布差异无显著性意义($P > 0.05$)。**结论** 雌激素受体基因型分布频率均符合 Hardy-Weinberg 定律,呼和浩特地区老年男性 ER α 基因基因 Pvu II 酶切位点与原发性骨质疏松症存在相关性。老年髋部骨折与雌激素受体基因多态性可能存在相关性。

关键词: 雌激素受体;骨质疏松症;基因多态性;髋部骨折;男性

Case-control study on ER α gene polymorphism in elderly males with hip fracture WANG Changhai¹, MA Zhixin², BI Lifu², et al. ¹Department of Orthopedic, the Inner Mongolia People's Hospital; ²The Second Hospital of Inner Mongolia Medical college, Hohhot 010017, China

Corresponding author: LI Ping, Email: liping5767@sina.com

Abstract: **Objective** To investigate the relationship between estrogen receptor (ER) gene polymorphism and osteoporosis in Han elderly males with hip fracture in Hohhot. **Methods** One hundred and twenty-eight elderly male patients with hip osteoporotic fracture were enrolled. One hundred and twenty-eight healthy people were enrolled and matched with age to conduct a case-control study. The bone mineral density and ER gene polymorphism measurement were performed to all subjects. **Results** The frequencies of ER PvuII genotype PP, Pp, and pp were 7.8%, 42.2%, and 50.0%, respectively, in the osteoporosis group. The frequencies of ER PvuII genotype PP, Pp, and pp were 13.3%, 53.9%, and 32.8%, respectively, in the control group. ANOVA test indicated that the difference of ER PvuII genotype frequency between the osteoporosis group and the control group was statistically significant ($P < 0.05$). The frequencies of ER XbaI genotype XX, Xx, and xx were 4.7%, 44.5%, and 50.8%, respectively, in the osteoporosis group. The frequencies of ER XbaI genotype XX, Xx, and xx were 3.1%, 39.1%, and 57.8%, respectively, in the control group. ANOVA test indicated that the difference of ER XbaI genotype frequency between the osteoporosis group and the control group was not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion** All frequency distribution of ER genotypes is fit for Hardy-Weinberg equilibrium. ER gene PvuII RFLP is related to osteoporosis in Han elderly males in Hohhot area. Elderly hip fractures may be associated with ER gene polymorphism.

作者单位: 1. 内蒙古自治区人民医院骨科, 内蒙古 呼和浩特 010017; 2. 内蒙古医学院第二附属医院, 内蒙古 呼和浩特 010050

作者简介: 王长海(1976-), 男, 汉族, 医学博士, 副主任医师, 研究方向: 骨质疏松、骨关节创伤。

通讯作者: 王长海, Email: wangchanghai.2008@163.com

Key words: Estrogen receptor; Osteoporosis; Gene polymorphism; Hip fracture; Male

随着人口老龄化,男性骨质疏松症的发病率也逐渐上升,与女性相比,男性骨质疏松性骨折的预后更差,以老年髌部骨折为例,髌部骨折当年死亡率男性比女性高,男性高达 37.5%^[1],因而男性骨质疏松症正逐渐被人们关注。男性骨质疏松症的影响因素很多,有研究者认为:强烈基因控制下的低骨峰值是决定男性特发性骨质疏松症的主要原因^[2]。更有研究显示^[3],遗传因素在影响骨密度的因素中可占到约 80%,对骨质疏松发生的危险性具有最佳预测作用。因此,许多学者将骨质疏松候选基因多态性与骨密度做相关分析。迄今,已有近 100 种骨质疏松相关基因被分析^[4],其中雌激素受体(estrogen receptor, ER)基因一直以来都是研究热点。由于男性骨质疏松症的发病年龄较女性大,发病率较女性小,人们对男性骨质疏松症的研究较女性少,所以,研究呼和浩特地区老年男性骨质疏松性髌部骨折患者 ER α 基因多态性可以进一步认清男性雌激素受体在严重骨质疏松症中水平及功能的变化,为治疗和预防本地区男性严重骨质疏松症提供一定理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 对象

病例组:2008 年 1 月至 2009 年 8 月内蒙古医学院第二附属医院老年汉族男性髌部骨折住院患者 128 人,所有患者均为轻度外伤而发生髌部骨折,经 DEXA 检测,诊断为骨质疏松。对照组:按年龄配比选取内蒙古长寿俱乐部汉族男性健康体检者 128 人。

1.2 方法

1.2.1 骨密度测定

所有被调查者均采用美国 GE 公司生产的 LUNAR-Bravo 双能 X 线骨密度仪进行腰椎骨密度测定。

1.2.2 ER 等位基因测定

(1) DNA 提取:白细胞 DNA 提取:酚和氯仿抽提法。(2) 检测 DNA 含量与纯度:取 DNA 溶液 5 μ l,加双蒸水 195 μ l 混匀后置于石英杯中,经紫外线分光光度计测定 OD₂₆₀、OD₂₈₀ 数值, DNA 纯度应用 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值分析,比值在 1.6 ~ 1.8 之间纯度高。(3) PCR 扩增:引物序列参考文献^[5],由上海生工生物工程技术有限公司合成,特异性扩增万方数据

产物的片段为 395 bp,序列如下:

上游引物 ER1F:5'-CATGAACCACCATGCTCAGT-3'下游引物 ER1R:5'-TACCTCTTGCCGTCTGTTGC-3'。

扩增后用紫外线凝胶图像分析系统分析并保存。(4) Xba I 和 Pvu II 限制性内切酶酶切:取 PCR 产物 1 μ g 分别进行 Xba I 和 Pvu II 酶切,酶切总体积为 20 μ l,置入电热恒温水浴箱中,反应温度为 37 $^{\circ}$ C,消化 8h。(5) 限制性片段长度多态性(RFLP)分析:酶切终止后应用 1.5% 琼脂糖凝胶水平电泳,100V 电压电泳 30min,然后用紫外线凝胶图像分析系统分析基因型。

1.2.3 数据统计学处理

用基因计数法分别统计病例组和对照组基因型和等位基因频率,数据经 Hardy-Weinberg 平衡检验后,用 SPSS13.0 统计软件分析。两组之间的基因型和等位基因频率差异用卡方检验,计量资料用 *t* 检验, *P* < 0.05 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

128 例老年髌部骨折病例中,患者平均年龄 (73.45 $\pm$ 7.28) 岁,其中股骨颈骨折 47 例,股骨粗隆间骨折 81 例,行腰椎骨密度检查后,按照国内骨质疏松诊断标准均为严重骨质疏松症患者。对照组 128 人行腰椎骨密度检查后,均为骨量正常或骨量减少人群,平均年龄 (72.84 $\pm$ 6.63) 岁,经 *t* 检验: *t* = 3.546, *P* = 0.287 (*P* > 0.05),病例组与对照组在年龄方面差异无统计学意义。

2.2 RFLP 的结果分析

酶切终止后应用 1.5% 琼脂糖凝胶水平电泳,100V 电压电泳 30min,然后用紫外线凝胶图像分析系统分析基因型。RFLP 的结果用 P 或 p 和 X 或 x 表示,限制性酶切位点存在者用小写字母表示,缺失者用大写字母表示。ER α 基因 Xba I 多态性位点电泳结果为:XX 型可见单一条带 395bp, xx 型可见 221bp、174bp 两条带, Xx 型可见 395bp、221bp、174bp 三条带;Pvu II 多态性位点电泳结果为:PP 型可见单一条带 395bp, pp 型可见 176bp、219bp 两条带, Pp 型可见 395bp、176bp、219bp 三条带。

2.3 骨折组(严重 OP 组)与对照组 Pvu II 基因型和等位基因分布频率比较

Pvu II 基因型和等位基因分布频率情况见表 1,

骨折组基因型多态性 PP、Pp、pp 分布频率:7.8%、42.2%、50.0%,对照组基因型多态性 PP、Pp、pp 分布频率:13.3%、53.9%、32.8%,骨折组和对照组 PP、Pp、pp 3 种基因型分布频率的差异有统计学意义 ($\chi^2 = 8.210, P = 0.016$)。骨折组中 P 和 p 等位基

因分布频率分别为 22.7%、77.3%,对照组中 P 和 p 等位基因分布频率分别为 40.2%、59.8%。骨折组和对照组 P 和 p 等位基因分布频率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 7.262, P = 0.007$)。

表 1 骨折组与对照组 Pvu II 基因型和等位基因分布频率比较 (n = 128)

多态位点	组别	例数	基因型频率 (%) *			等位基因频率 (%) **	
			PP	Pp	pp	P	p
Pvu II	骨折组	128	10(7.8)	54(42.2)	64(50.0)	74(22.7)	182(77.3)
	对照组	128	17(13.3)	69(53.9)	42(32.8)	103(40.2)	153(59.8)

注: * $\chi^2 = 8.210, P = 0.016$; ** $\chi^2 = 7.262, P = 0.007$

2.4 骨折组(OP组)与对照组 Xba I 基因型和等位基因分布频率比较

Xba I 基因型和等位基因分布频率情况见表 2,骨折组基因型多态性 XX、Xx、xx 分布频率:4.7%、44.5%、50.8%,对照组基因型多态性 XX、Xx、xx 分布频率:3.1%、39.1%、57.8%,骨折组和对照组

XX、Xx、xx 3 种基因型分布频率的差异无统计学意义 ($\chi^2 = 1.441, P = 0.487$)。骨折组中 X 和 x 等位基因分布频率分别为 27.0%、73.0%,对照组中 X 和 x 等位基因分布频率分别为 22.7%、77.3%。骨折组和对照组 X 和 x 等位基因分布频率差异无统计学意义 ($\chi^2 = 1.267, P = 0.260$)。

表 2 骨质疏松组与对照组 Xba I 基因型和等位基因分布频率比较 (n = 128)

多态位点	组别	例数	基因型频率 (%) *			等位基因频率 (%) **	
			XX	Xx	xx	X	x
Xba I	骨折组	128	6(4.7)	57(44.5)	65(50.8)	69(27.0)	187(73.0)
	对照组	128	4(3.1)	50(39.1)	74(57.8)	58(22.7)	198(77.3)

注: * $\chi^2 = 1.441, P = 0.487$; ** $\chi^2 = 1.267, P = 0.260$

3 讨论

老年人髋部骨折是骨质疏松症的严重并发症,严重危害老年人健康,由于男性骨质疏松症的发病年龄较女性大,发病率较女性小,所以对男性骨质疏松症的研究较女性少。

雌激素是一种类固醇激素,在体内雌激素是由芳香化酶催化雄激素转化而来的,外周雌激素主要由卵巢、睾丸产生。雌激素呈脂溶性,其靶组织众多,包括生殖系统、骨骼、心血管等。骨是雌激素发挥作用的重要靶器官之一,在成骨细胞、破骨细胞、间叶干细胞、骨细胞中均有雌激素受体的存在,雌激素可通过细胞受体途径发挥抗骨质疏松作用^[6]。目前研究较多且与骨质疏松关系较密切的是 Pvu II 和 XbaI 的多态性。相对于女性,男性雌激素受体基因多态性与骨密度关系的报道很少,且争议很大。Ongphiphadhanakul 等^[7]研究了一组年龄 20~79 岁的泰国男性人群,发现带有 P 基因型的受检者具有较高的腰椎骨密度。一些肯定男性雌激素受体基因多态性与骨密度具有明显相关关系研究陆续报道^[8-10]。然而在芬兰^[11]与韩国^[12]的相关研究中却没发现男性雌激素受体基因多态性与骨密度有明显

相关性。成年男性雌激素受体基因多态性与骨密度缺乏相关性的研究^[13,14]也陆续被报道。以上研究结果具有明显不一致性,究其原因可能为:(1)对样本数量、年龄、性别、疾病等因素的控制水平不同,(2)种族及地域不同。为阐明男性雌激素受体基因多态性与骨密度的确切关系,还需要不同国家、不同地区、不同种族的相关研究。据此,我们研究了雌激素基因在我国呼和浩特地区汉族男性的分布,并进一步探讨了其与骨质疏松症的相关关系,试图为进一步阐明呼和浩特地区男性骨质疏松症的发病机制,为治疗和预防本地区男性骨质疏松症提供一定的理论依据。

本研究测得呼和浩特地区汉族男性 Pvu II、Xba I 基因型和等位基因分布频率的数据与章振林等^[15]在上海的研究结果有一定差异,可能与本研究选择研究对象有关。我们选择老年髋部骨折且骨密度检查为骨质疏松症的患者作为病例组,对照组则是根据年龄配比骨量正常或骨量减少的健康人群,通过分别比较 Pvu II、Xba I 等位基因在患病组和对照组中出现的频率,来分析以上等位基因与骨质疏松的相关性。结果显示,Xba I 基因型和等位基因分布频率虽然 OP 组与对照组有差异(具体见表

1),但统计分析后此差异无统计学意义,Pvu II 基因型和等位基因分布频率 OP 组与对照组有差异(具体见表2),经统计分析,骨质疏松组和对照组 PP、Pp、pp3 种基因型分布频率的差异有统计学意义($X^2 = 8.210, P = 0.016$),骨质疏松组和对照组 P 和 p 等位基因分布频率差异有统计学意义($X^2 = 7.262, P = 0.007$),这与 Cepollaro 等^[5]的研究结果接近。国内王金堂等^[16]对陕西关中地区绝经后女性研究结果显示,雌激素受体基因 Pvu II 多态性可能对股骨颈和 Ward 三角 BMD 有一定的影响。对本研究进一步分析,可能是 P 基因型携带者骨密度高,对照组 P 基因型携带者比例高,故髌部不易骨折,而病例组正相反,P 基因型携带者少导致股骨近端骨密度低,髌部骨折易发。

4 结论

综上所述,研究不同地区、不同民族男性雌激素受体基因 Pvu II、Xba I 基因型和等位基因分布频率及其与骨质疏松症的关系,有助于男性骨质疏松症的基因水平诊断和治疗。呼和浩特地区汉族男性雌激素受体基因 Pvu II、Xba I 基因型和等位基因分布有一定的地区特点,雌激素受体基因 Pvu II 多态性可能影响男性股骨近端骨密度,进而影响老年男性髌部骨折的发生。

【参 考 文 献】

- [1] Jiang HX, Majumdar SR, Dick DA, et al. Development and initial validation of a risk score for predicting in-hospital and 1-year mortality in patients with hip fractures. *J Bone Miner Res*, 2005, 20:494-500.
- [2] Kastelan D, Grubic Z, Kraljevic I, et al. The role of estrogen receptor-alpha gene TA polymorphism and aromatase gene TTTA polymorphism on peak bone mass attainment in males; is there an additive negative effect of certain allele combinations? *J Bone Miner Metab*, 2009, 27(2):198-204.
- [3] Gueguen R, Jouanny P, Guillemin F, et al. Segregation analysis and variance components analysis of bone mineral density in healthy families. *J Bone Miner Res*, 1995, 12:2017-2022.
- [4] 章振林. 骨质疏松与遗传. *中国全科医学*, 2007, 10(22):1849-1851.
- [5] Cepollaro C, Lauretani F, Gozzini A, et al. Relationship of volumetric bone mineral density and structural parameters with ERalpha gene polymorphisms. *Calcif Tissue Int*, 2007, 80(5):307-15.
- [6] 樊官伟,何俊,王虹,等. 雌激素及其受体信号转导途径的研究进展. *中国临床药理学与治疗学*, 2007, 12(3):266-269.
- [7] Ongphiphadhanakul B, Rajatanavin R, Chanprasertyothin S, et al. Estrogen receptor gene polymorphism is associated with bone mineral density in pre-menopausal women but not in post-menopausal women. *J Endocrinol Invest*, 1998, 21:487-493.
- [8] Van Meurs JBJ, Schuit SCE, Weel AE, et al. Association of 5' estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density, vertebral bone area and fracture risk. *Hum Mol Genet*, 2003, 12:1745-1754.
- [9] Lorentzon M, Lorentzon R, Backstrom T, et al. Estrogen receptor gene polymorphism, but not estradiol levels, is related to bone density in healthy adolescent boys: a cross-sectional and longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999, 84:4597-4601.
- [10] Remes T, Vaisanen SB, Mahonen A, et al. Aerobic exercise and bone mineral density in middle-aged Finnish men: a controlled randomized trial with reference to androgen receptor, aromatase, and estrogen receptor alpha gene polymorphisms. *Bone*, 2003, 32:412-420.
- [11] Valimaki VV, Pioppo K, Valimaki S, et al. The relation of the XbaI and PvuII polymorphisms of the estrogen receptor gene and the CAG repeat polymorphism of the androgen receptor gene to peak bone mass and bone turnover rate among young healthy men. *Osteoporos Int*, 2005, 16:1633-1640.
- [12] Koh JM, Kim DJ, Hong JS, et al. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms PvuII and XbaI influence association between leptin receptor gene polymorphism (Gln223Arg) and bone mineral density in young men. *Eur J Endocrinol*, 2002, 147:777-783.
- [13] Khosla S, Riggs BL, Atkinson EJ, et al. Relationship of estrogen receptor genotypes to bone mineral density and to rates of bone loss in men. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89:1808-1816.
- [14] Dennison E, Syddall H, Fall C, et al. Hertfordshire Cohort Study Group. Evidence of sexual dimorphism in relationships between estrogen receptor polymorphisms and bone mass: the Hertfordshire study. *J Rheumatol*, 2005, 32:2400-2404.
- [15] 章振林,秦跃娟,何进卫,等. 雌激素受体-α 基因 Xba I、Pvu II 和 BstU I 多态性与男性骨量的关系. *中华医学遗传学杂志*, 2005, 22(4):447-449.
- [16] 王金堂,贾光辉,刘广宇,等. 雌激素受体基因多态性与陕西关中地区绝经后妇女骨密度的相关性. *西安交通大学学报(医学版)*, 2008, 29(2):206-209.

(收稿日期:2011-10-17)

老年男性髋部骨折患者ER α 基因多态性的病例对照研究

作者: 王长海, 栗平, 马志新, 毕力夫

作者单位: 王长海(内蒙古自治区人民医院骨科, 内蒙古呼和浩特, 010017), 栗平, 马志新, 毕力夫(内蒙古医学院第二附属医院, 内蒙古呼和浩特, 010050)

刊名: 中国骨质疏松杂志 

英文刊名: Chinese Journal of Osteoporosis

年, 卷(期): 2012, 18(3)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201203005.aspx