

骨质疏松性骨折与 OPG-RANK-RANKL 系统基因多态性的关联分析

李天清¹ 王金堂^{2*} 马真胜¹ 雷伟¹ 王林¹ 李萌²

1. 第四军医大学第一附属医院脊柱二科, 西安 710032

2. 西安交通大学第一附属医院骨科, 西安 710061

中图分类号: R68 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2014) 03-0247-09

摘要: **目的** 从基因水平分析 OPG-RANK-RANKL 系统基因多态性与髋部骨质疏松性骨折的复杂关联关系。**方法** 采用关联分析,以 OPG-RANK-RANKL 基因为候选基因,以 700 个无关汉族个体为研究对象,对候选基因的 75 个 SNP 进行了分型实验。根据分型结果,利用 Haploview 进行了单体型识别,并对单体型识别的结果与髋部骨折表型进行关联分析。**结果** Haploview 分析识别出了 OPG-RANK-RANKL 基因每个单体域的单体型,并挑选出标签 SNP。**结论** 关联分析的结果表明,位于 OPG 基因的 SNP 位点 rs2460985、位于 RANK 基因的 rs1805034、位于 RANKL 基因的 rs9525625 与髋部骨折之间存在相关性 (rs2460985, $P = 0.0299$; rs1805034, $P = 0.0234$; rs9525625, $P = 0.0144$), 这证明 OPG-RANK-RANKL 系统在调节骨代谢方面起了重要的作用。利用 haploview 进行的单体型关联分析结果发现,OPG 单体域 1 内 CACC, RANK 单体域 1 内 AAAAA, RANKL 单体域 1 内 CAAACC 和单体域 3 内 AAACACAA 都与骨折存在关联,在病例组和对照组中的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**关键词:** 骨质疏松症; OPG-RANK-RANKL; 单核苷酸多态性; 单体型

Correlation analysis of the relationship between the osteoporotic fracture and OPG-RANK-RANKL gene polymorphisms

LI Tianqing¹, WANG Jintang², MA Zhensheng¹, LEI Wei¹, WANG Lin¹, LI Meng²

1. The Second Department of Spinal Surgery, the First Affiliated Hospital of the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032

2. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

Corresponding author: WANG Jintang, Email: mlltq@163.com

Abstract: **Objective** To analyze the complex relationship between the OPG-RANK-RANKL gene polymorphisms and the hip osteoporotic fracture at gene level. **Methods** In this study, the method of correlation analysis was applied. OPG-RANK-RANKL gene was selected as candidate gene. The classification analysis of 75 single nucleotide polymorphisms (SNPs), which were selected from OPG-RANK-RANKL genes, was performed in 700 unrelated Han individuals. According to the results, the haplotypes was identified using Haploview. And the correlation analysis of the relationship between the identified results and the phenotype of the hip fracture was performed. **Results** Each haplotype of OPG-RANK-RANKL gene was identified using Haploview. And the tagSNPs were selected. **Conclusion** The results of correlation analysis showed that 3 SNPs, rs2460985 locating in OPG gene, rs1805034 locating in RANK gene, and rs9525625 locating in RANKL gene, were correlated with the hip fracture (rs2460985, $P = 0.0299$; rs1805034, $P = 0.0234$; rs9525625, $P = 0.0144$), indicating that OPG-RANK-RANKL system played an important role in the regulation of bone metabolism. The results also showed that haplotype block 1 (CACC) in OPG gene, haplotype block 1 (AAAAA) in RANK gene, and haplotype block 1 (CAAACC) and haplotype block 3 (AAACACA) in RANKL gene were associated with the fracture. The difference between the study group and the control group was significant ($P < 0.05$).

Key words: Osteoporosis; OPG-RANK-RANKL; Single nucleotide polymorphisms; Haplotype

BMC	Bone mineral content	骨矿含量
BMD	Bone mineral density	骨密度
OF	Osteoporotic Fracture	骨质疏松性骨折
OP	Osteoporosis	骨质疏松症

骨质疏松症是一种以骨量减少、骨组织显微结构受损、骨矿物成分和骨基质等比例地不断减少、骨脆性增加和骨折危险度升高为特征的一种全身骨代谢障碍遗传性疾病,遗传率高达 50% ~ 90%。骨质疏松症的严重后果是骨折,以髌部骨折最为严重。骨质疏松症和骨质疏松性骨折 (Osteoporotic fracture, OF) 是最常见的老年性疾病,它是中老年多发的一种退行性疾病,骨质疏松性骨折是骨质疏松症的最严重后果。

OPG/RANK/RANKL 系统对骨质疏松的发病机制和治疗有着重要的影响,特别是 RANKL 和 OPG 比率的变化可以直接影响破骨细胞的发育,进而影响到骨代谢。

1 目的

以 OF 作为直接研究表型。用基因组对照关联法和结构关联法这两种无偏的关联统计方法研究候选基因与 OF 及其相关基因之间的关系。

2 方法

征集了 400 例大于 55 周岁的 OF 病例(女性 246 人)和 400 例大于 55 周岁的健康人群(女性 221 人),其中分型成功的有 700 例。所有的研究个体都来自汉族群体,加入研究时都签署了知情同意书,同时经过了严格的排除标准,减少非遗传因素对骨质疏松症的影响。

2.1 DNA 的提取

DNA 提取所用的试剂盒由百泰克生物公司生产,主要包括红细胞裂解液、细胞核裂解液、蛋白沉

淀液和 DNA 溶解液。

2.2 SNP 分型实验 S

1) DNA 稀释;2) 准备反应预混试剂;3) 点样;4) 创建绝对定量(AQ)反应板文件;5) 执行扩增程序

SNP 分型时 PCR 扩增需要的引物和探针序列由西安交通大学统计遗传学实验室设计完成,美国应用生物系统(ABI)公司合成。

2.3 读取扩增后荧光信号

Haploview 是从最初的基因型数据中得出连锁不平衡的计算结果和人群的单体型模式的强有力的工具。Haploview 在通过计算排除不符合 Hardy-Weinberg 平衡的 SNP 和分型成功率小于 50% 的个体。Haploview 计算出两两 SNP 之间的 D 值,并依据 D 与预先所确定的域值范围的关系划分出染色体上单体域。在利用 Haploview 识别单体型之前,需要将分型实验所得到的基因型数据整理成 Haploview 所能识别的文件类型。

(1) info 文件

Info 文件是 Haploview 识别单体型所需要的文件之一,记载有两列信息,第一列是 SNP 的 id,第二列是各个 SNP 在染色体上的位置。在记事本内整理好这些信息后将 txt 后缀修改成 info 即成为 Haploview 所能识别的 SNP data。

(2) ped 文件

Ped 文件主要记载样本的基本信息和基因型信息。

(3) 单体型识别操作过程

3 结果

共 700 个个体分型成功。

每个 SNP 的分型结果整理后如下表所示(表 1、2、3)。

表 1 OPG 基因 SNP 分型结果
Tab. 1 The classification result of SNPs in OPG gene

SNP 编号	SNP 全称	ID	% Geno ⁽¹⁾	MAF ⁽²⁾	M. A. ⁽³⁾
1	SNP_A-2087412	rs1521154	98. 6	0. 455	A
2	SNP_A-2177593	rs2514602	98. 7	0. 14	C
3	SNP_A-4258649	rs10453061	95	0. 183	A
4	SNP_A-2141150	rs2460983	99. 9	0. 148	A
5	SNP_A-4235348	rs2460985	98. 5	0. 273	A
6	SNP_A-4227654	rs7841489	90. 9	0. 068	C
7	SNP_A-1859720	rs7000310	100	0. 464	C
8	SNP_A-1946690	rs3103970	99. 3	0. 283	A
9	SNP_A-1808265	rs3134093	100	0. 468	C

续表 1

SNP 编号	SNP 全称	ID	% Geno ⁽¹⁾	MAF ⁽²⁾	M. A. ⁽³⁾
10	SNP_A-4213207	rs3890832	95. 9	0. 309	A
11	SNP_A-1929189	rs10955911	92. 6	0. 129	C
12	SNP_A-2129369	rs3102724	92. 9	0. 413	C
13	SNP_A-2064673	rs3102725	94. 6	0. 129	C
14	SNP_A-2066991	rs11573870	99. 1	0. 153	C
15	SNP_A-2241736	rs3134061	99. 9	0. 149	C
16	SNP_A-1994847	rs11573838	93. 6	0. 141	C
17	SNP_A-1994849	rs10505346	99. 6	0. 164	A
18	SNP_A-1994852	rs10505349	97. 1	0. 158	C
19	SNP_A-2129326	rs1385495	98. 1	0. 479	C

表 2 RANK 基因 SNP 分型结果

Table 2 The classification result of SNPs in RANK gene

SNP 编号	SNP 全称	ID	% Geno ⁽¹⁾	MAF ⁽²⁾	M. A. ⁽³⁾
1	SNP_A-1900856	rs4941125	100	0. 394	C
2	SNP_A-1958660	rs8086340	100	0. 358	C
3	SNP_A-1921364	rs1805034	97. 7	0. 308	C
4	SNP_A-1788857	rs17069895	98	0. 173	C
5	SNP_A-2276395	rs7231887	100	0. 164	A
6	SNP_A-1921373	rs17069904	99. 7	0. 148	C
7	SNP_A-2278702	rs12959396	96	0. 167	C
8	SNP_A-2005726	rs3017359	99. 9	0. 348	C
9	SNP_A-1921379	rs17665435	100	0. 074	C
10	SNP_A-2277302	rs17069956	95. 7	0. 066	A

表 3 RANKL 基因 SNP 分型结果

Table 3 The classification result of SNPs in RANKL gene

SNP 编号	SNP 全称	ID	% Geno ⁽¹⁾	MAF ⁽²⁾	M. A. ⁽³⁾
1	SNP_A-2151856	Rs7992970	100	0. 329	C
2	SNP_A-1816202	Rs9594738	99. 7	0. 084	C
3	SNP_A-2118508	Rs7987211	100	0. 131	C
4	SNP_A-2130898	Rs10507507	94. 7	0. 125	C
5	SNP_A-2130899	Rs17535675	99. 7	0. 136	C
6	SNP_A-2130901	Rs7994531	98	0. 397	C
7	SNP_A-1804063	Rs12874142	100	0. 136	A
8	SNP_A-2228057	Rs7326472	93	0. 108	A
9	SNP_A-1894917	Rs12864265	99. 4	0. 184	C
10	SNP_A-2188915	Rs6561045	97. 1	0. 233	C
11	SNP_A-2040821	Rs7316953	94. 4	0. 198	C
12	SNP_A-2033727	Rs1324005	97	0. 17	C
13	SNP_A-2226987	Rs9525625	99. 6	0. 176	A
14	SNP_A-4283618	Rs720824	99. 7	0. 185	C
15	SNP_A-2130940	Rs9315919	94. 6	0. 21	A
16	SNP_A-1785767	Rs17536002	99. 4	0. 186	C
17	SNP_A-1923193	Rs7334307	99. 9	0. 43	C
18	SNP_A-2057875	Rs927623	99. 3	0. 187	C
19	SNP_A-2130954	Rs912423	99. 7	0. 22	C
20	SNP_A-4194801	Rs9594770	96. 3	0. 148	C
21	SNP_A-4273459	Rs4942131	99. 4	0. 193	C
22	SNP_A-2023838	Rs17536071	95. 1	0. 164	C
23	SNP_A-2160867	Rs9525630	100	0. 194	C
24	SNP_A-1891598	Rs9533128	98. 9	0. 05	C
25	SNP_A-2214441	Rs9315923	98. 4	0. 373	C

续表 3

SNP 编号	SNP 全称	ID	% Geno ⁽¹⁾	MAF ⁽²⁾	M. A. ⁽³⁾
26	SNP_A-2075745	Rs4941430	100	0.187	C
27	SNP_A-1906544	Rs17458078	99.6	0.496	C
28	SNP_A-2210007	Rs1038435	99	0.061	C
29	SNP_A-2140234	Rs17596685	99.1	0.311	A
30	SNP_A-2117454	Rs9594780	99.3	0.146	A
31	SNP_A-4226628	Rs168312	98.7	0.316	A
32	SNP_A-1924297	Rs9533156	94.9	0.497	A
33	SNP_A-2200765	Rs9525641	100	0.477	C
34	SNP_A-2101665	Rs4942143	93.1	0.271	A
35	SNP_A-2202749	Rs2148073	100	0.305	C
36	SNP_A-2049917	Rs346591	94.7	0.287	C
37	SNP_A-4283636	Rs1325803	99	0.136	C
38	SNP_A-1945691	Rs9567011	98.7	0.341	A
39	SNP_A-2132587	Rs1325790	96.7	0.414	A
40	SNP_A-2131126	Rs10507513	97.3	0.417	A
41	SNP_A-1821101	Rs9533208	98.9	0.265	C
42	SNP_A-1832439	Rs7994457	99.9	0.27	C
43	SNP_A-2230407	Rs2761147	92.4	0.236	A
44	SNP_A-1808093	Rs6561072	100	0.406	C
45	SNP_A-2268650	Rs17597366	97.9	0.151	C
46	SNP_A-2167043	Rs7998938	100	0.494	A

注：(1) % Geno;SNP 分型成功率;(2) MAF;Minor Allele Frequency,最小等位基因频率;(3) M. A. ;最小等位基因

本研究中 SNP 均符合 Hardy–Weinberg 平衡。别如下(图 1、2、3、4、5、6)所示：
根据所选定的阈值,生成的连锁不平衡图谱分

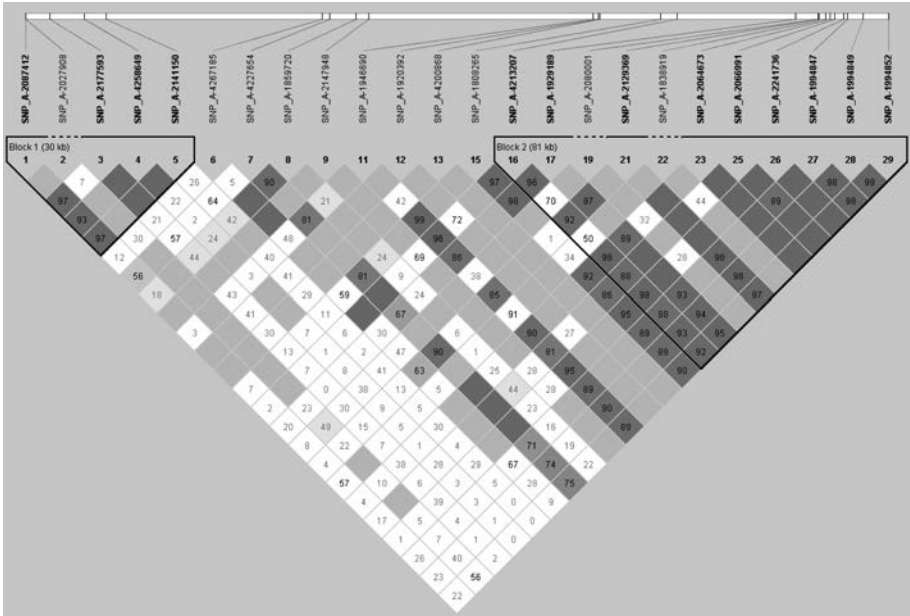


图 1 生成的连锁不平衡图谱 (OPG)
Fig. 1 The generated atlas of linkage disequilibrium (OPG)

说明：
图内显示了 OPG、RANK、RANKL 基因的单体型、每个单体型在人群内所占的频率以及单体域之间的关系。单体型上面是 SNP 的序号。

3.1 SNP 位点的统计分析结果
本研究主要在 700 个汉族人群中对 3 个基因 OPG、RANK、RANKL 的 75 个 SNP 位点进行分型,统计分型结果,并且对分型结果进行了初步的统计学

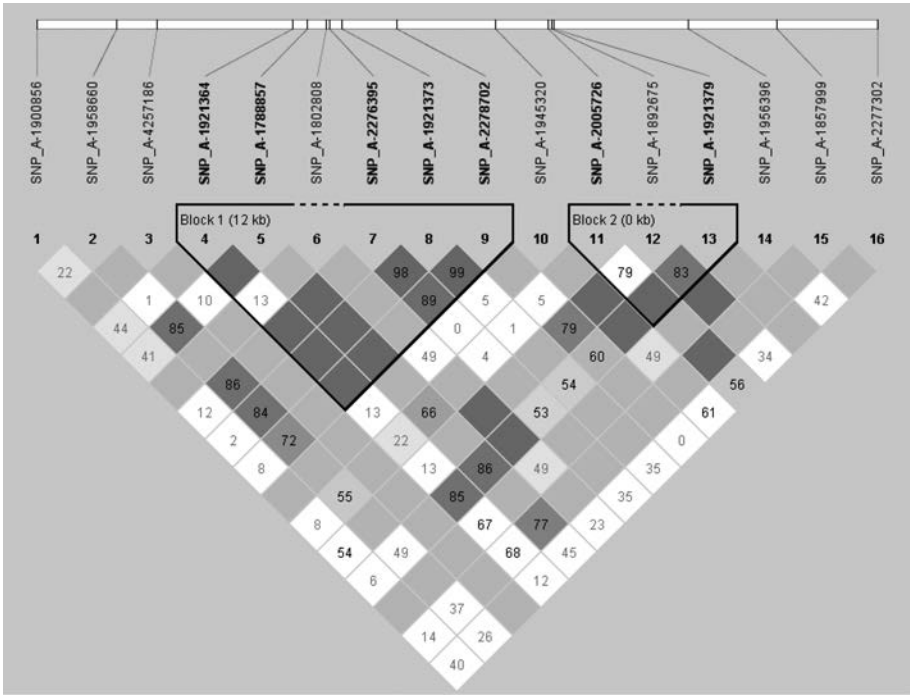


图 2 生成的连锁不平衡图谱(RANK)

Fig. 2 The generated atlas of linkage disequilibrium (RANK)

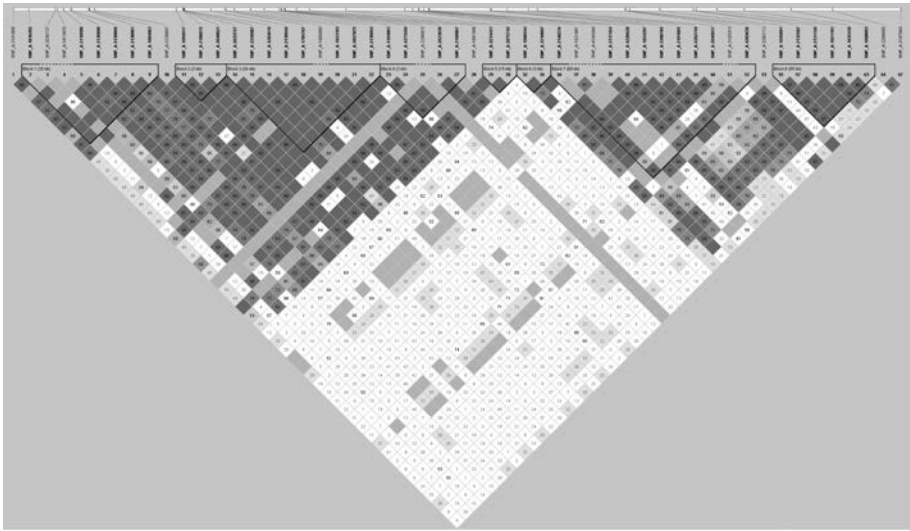


图 3 生成的连锁不平衡图谱(RANKL)

点击 Chech Markers 后生成研究对象的最小等位基因的单体型图

Fig. 3 The generated atlas of linkage disequilibrium (RANKL)

分析。首先采用自由度为 1 的 χ^2 检验验证 SNP 位点是否达到 HWE,结果发现 SNPrs2761147 位点未达到 HWE。

哈迪-温伯格不平衡 (Hardy-Weinberg Disequilibrium, HWD)产生的原因主要有近亲交配,群体分层及选择等。PCR-引物位点突变或将杂合子错误分型为纯合子也会造成 HWD。虽然,HWE

的背离,即 HWE 检验后 $P = 10^{-3}$ 或 10^{-4} 甚至更小时,也可以是疾病关联的征兆,但是对这种现象的解释还在摸索中。因此,当 SNP 位点的分型结果不满足 HWE 时,该位点通常不纳入后续的关联研究。

3.2 利用 haploview 进行关联分析的结果

利用 haploview 进行关联分析的结果表明上面达到 HWE 的 SNP rs2460985、rs1805034、rs9525625

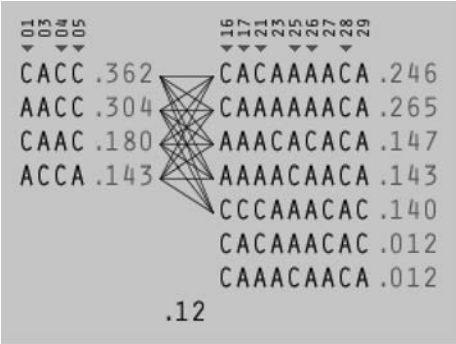


图 4 OPG 单体型图
Fig. 4 Haplotype of OPG

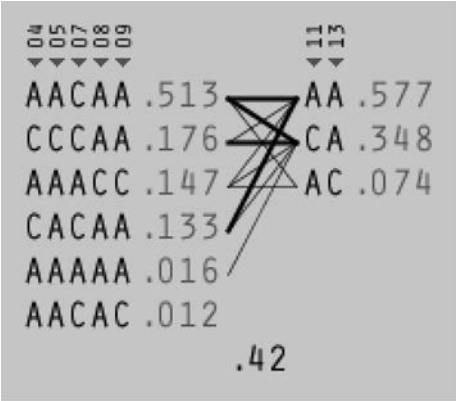


图 5 RANK 单体型图
Fig. 5 Haplotype of RANK

表 4 利用 haploview 进行关联分析的结果 RANK
Table 4 The result of correlation analysis using Haploview (RANK)

ID	% Geno ⁽¹⁾	MAF ⁽²⁾	M. A. ⁽³⁾	P value
rs4941125	100	0.394	A/G	0.4168
rs8086340	100	0.358	C/G	0.3765
rs1805034	97.7	0.308	C/T	0.0234
rs17069895	98	0.173	C/T	0.1005
rs7231887	100	0.164	A/G	0.117
rs17069904	99.7	0.148	A/G	0.2829
rs12959396	96	0.167	G/T	0.2734
rs3017359	99.9	0.348	A/C	0.162
rs17665435	100	0.074	A/T	0.3378
rs17069956	95.7	0.066	C/T	0.767

位点在 2 组人群中的差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), OPG、RANK、RANKL 基因位点多态性对骨质疏松性骨折有影响 (表 4、5、6)。

表 5 利用 haploview 进行关联分析的结果 OPG

Table 5 The result of correlation analysis using Haploview (OPG)

ID	% Geno ⁽¹⁾	MAF ⁽²⁾	M. A. ⁽³⁾	P value
rs1521154	98.6	0.455	A/G	0.0690
rs2514602	98.7	0.14	A/C	0.9286
rs10453061	95	0.183	C/T	0.5749
rs2460983	99.9	0.148	G/T	0.8869
rs2460985	98.5	0.273	C/T	0.0299
rs7841489	90.9	0.068	A/G	0.2582
rs7000310	100	0.464	C/T	0.8183
rs3103970	99.3	0.283	C/G	0.6101
rs3134093	100	0.468	C/T	0.4776
rs3890832	95.9	0.309	C/G	0.7612
rs10955911	92.6	0.129	A/G	0.5908
rs3102724	92.9	0.413	A/G	0.5131
rs3102725	94.6	0.129	A/G	0.6249
rs11573870	99.1	0.153	C/T	0.6634
rs3134061	99.9	0.149	A/T	0.4295
rs11573838	93.6	0.141	A/G	0.7602
rs10505346	99.6	0.164	G/T	0.5776
rs10505349	97.1	0.158	C/G	0.8543
rs1385495	98.1	0.479	G/T	0.2427

表 6 利用 haploview 进行关联分析的结果 RANKL

Table 6 The result of correlation analysis using Haploview (RANKL)

ID	% Geno ⁽¹⁾	MAF ⁽²⁾	M. A. ⁽³⁾	P value
rs7992970	100	0.329	A/G	0.5453
rs9594738	99.7	0.084	C/T	0.0533
rs7987211	100	0.131	C/T	0.1525
rs10507507	94.7	0.125	C/T	0.3094
rs17535675	99.7	0.136	A/C	0.3944
rs7994531	98	0.397	C/T	0.4079
rs12874142	100	0.136	C/T	0.538
rs7326472	93	0.108	A/G	0.3172
rs12864265	99.4	0.184	A/G	0.8786
rs6561045	97.1	0.233	C/T	0.5638
rs7316953	94.4	0.198	C/T	0.8036
rs1324005	97	0.17	C/G	0.6284
rs9525625	99.6	0.176	C/T	0.0144
rs720824	99.7	0.185	A/T	0.7712

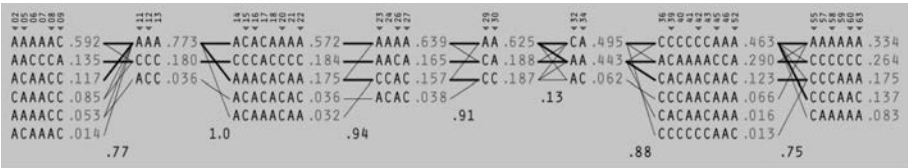


图 6 RANKL 单体型图
Fig. 6 Haplotype of RANKL

续表 6

ID	% Geno ⁽¹⁾	MAF ⁽²⁾	M. A. ⁽³⁾	p value
rs9315919	94. 6	0. 21	A/T	0. 8143
rs17536002	99. 4	0. 186	C/T	0. 6924
rs7334307	99. 9	0. 43	A/G	0. 1362
rs927623	99. 3	0. 187	C/T	0. 6864
rs912423	99. 7	0. 22	A/T	0. 9938
rs9594770	96. 3	0. 148	A/G	0. 2141
rs4942131	99. 4	0. 193	A/G	0. 5071
rs17536071	95. 1	0. 164	C/T	0. 7497
rs9525630	100	0. 194	G/T	0. 5187
rs9533128	98. 9	0. 05	C/T	0. 1666
rs9315923	98. 4	0. 373	C/T	0. 4277
rs4941430	100	0. 187	A/G	0. 4308
rs17458078	99. 6	0. 496	A/C	0. 7489
rs1038435	99	0. 061	A/G	0. 4746
rs17596685	99. 1	0. 311	C/T	0. 9199
rs9594780	99. 3	0. 146	A/G	0. 7348
rs168312	98. 7	0. 316	A/G	0. 9925
rs9533156	94. 9	0. 497	C/T	0. 8257
rs9525641	100	0. 477	C/T	0. 8382
rs4942143	93. 1	0. 271	A/G	0. 5405
rs2148073	100	0. 305	C/G	0. 8819
rs346591	94. 7	0. 287	A/T	0. 8973
rs1325803	99	0. 136	C/T	0. 9773
rs9567011	98. 7	0. 341	A/G	0. 7199
rs1325790	96. 7	0. 414	G/T	0. 4455
rs10507513	97. 3	0. 417	A/T	0. 5395
rs9533208	98. 9	0. 265	A/T	0. 0694
rs7994457	99. 9	0. 27	A/G	0. 0586
rs2761147	92. 4	0. 236	A/G	不符合 HW
rs6561072	100	0. 406	C/T	0. 1453
rs17597366	97. 9	0. 151	A/G	0. 779
rs7998938	100	0. 494	A/G	0. 2628

1) *P* 值小于 0. 05 的以黑斜体显示。
(1) MAF; Minor Allele Frequency, 最小等位基因频率; (2) M. A. ; Minor Allele, 最小等位基因。

2) haploview 关联分析的结果表明 rs2460985、rs1805034、rs9525625 的多态性对骨折有影响。

3.3 利用 haploview 进行的单体型关联分析结果

由于本研究中三个基因的单体型都有两个或者两个以上的 SNP 组成, 单个 SNP 与骨折不存在关联不代表不同的单体型对表型没有影响。可能 SNP 之间不同的组合方式会对表型产生影响。所以有必要分析每个单体型不同的单体型与 OF 之间的相关性。

利用 haploview 进行的单体型关联分析结果如下(表 7、8、9):

表 7 OPG 单体型关联分析结果

Table 7 The correlation analysis result of OPG haplotype				
Block	SNPs	htSNP	Freq.	<i>P</i> Value
Block1	1-5	1, 4, 5		
CACC			0. 362	0. 0277
AACC			0. 304	0. 0608
CAAC			0. 18	0. 651
ACCA			0. 143	0. 8909
Block2	16, 17, 19, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29	16, 17, 21, 25, 26, 28		
CAAAAAACA			0. 265	0. 4054
CACAAAAACA			0. 246	0. 6857
AAACACACA			0. 147	0. 547
AAAACAACA			0. 143	0. 6533
CCCAAAACAC			0. 14	0. 3921
CACAAACAC			0. 012	0. 5252
CAAACAACA			0. 012	0. 8501

表 8 RANK 单体型关联分析结果

Table 8 The correlation analysis result of RANK haplotype				
Block	SNPs	htSNP	Freq.	<i>P</i> Value
Block 1	4-9	4, 5, 7, 8, 9		
AACAA			0. 513	0. 5868
CCCAA			0. 176	0. 1314
AAACC			0. 147	0. 3831
CACAA			0. 133	0. 2445
AAAAA			0. 016	0. 0228
AACAC			0. 012	0. 6554
Block 2	11, 12, 13	11, 13		
AA			0. 577	0. 0629
CA			0. 348	0. 1614
AC			0. 074	0. 3378

表 9 RANKL 单体型关联分析结果

Table 9 The correlation analysis result of RANKL haplotype				
Block	SNPs	htSNP	Freq.	<i>P</i> Value
Block 1	2-9	2, 5, 8, 9		
AAAAAC			0. 592	0. 1816
AACCCA			0. 135	0. 3918
ACAACC			0. 117	0. 3634
CAAACC			0. 085	0. 039
AAAACC			0. 053	0. 3939
ACAAAC			0. 014	0. 1575
Block 2	11, 12, 13	11, 12		
AAA			0. 773	0. 6231
CCC			0. 18	0. 9616
ACC			0. 036	0. 2953
Block 3	14-22	15, 16, 20, 22		
ACACAAAA			0. 572	0. 1595
CCCCCCCC			0. 184	0. 8046

续表 6

Block	SNPs	htSNP	Freq.	P Value
AAACACAA			0.175	0.0152
ACACACAC			0.036	0.2802
ACAAACAA			0.032	0.4907
Block 4	23,27	23,26,27		
AAAA			0.639	0.4371
AACA			0.165	0.7302
CCAC			0.157	0.2413
ACAC			0.038	0.3407
Block 5	29,30	29,30		
AA			0.625	0.5268
CA			0.188	0.9982
CC			0.187	0.4308
Block 6	32,34	32,34		
CA			0.495	0.7737
AA			0.443	0.9622
AC			0.062	0.487
Block 7	36,43,45, 46,51,52	39,42, 45,52		
CCCCC AAA			0.463	0.7297
ACAAAACCA			0.29	0.928
CACAACAAC			0.123	0.9485
CCCAACAAA			0.066	0.3702
CACAACAAA			0.016	0.2951
CCCCC AAC			0.013	0.4376
Block 8	55,57-60, 63	55,58,60, 63		
AAAAAA			0.334	0.5787
CCCCC			0.264	0.0583
CCCAAA			0.175	0.2761
CCCAAC			0.137	0.8569
CAAAAA			0.083	0.7178

利用 haploview 进行的单体型关联分析结果如下:单体型分析的结果表明,OPG 单体域 1 内 CACC,RANK 单体域 1 内 AAAAA, RANKL 单体域 1 内 CAAACC 和单体域 3 内 AAACACAA 都与骨折存在关联,在病例组和对照组中的差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

据我们所知,这是第一次在中国人群研究中用 OF 发病率作为表型研究 OPG、RANK、RANKL 基因在骨代谢方面的作用。研究结果表明 OPG、RANK、RANKL 基因和我们所研究的群体的 OF 发病率关联。OPG、RANK、RANKL 基因可能对中国汉族人群髌部 OF 发病率的变化起到影响。

4 讨论

4.1 OPG-RANK-RANKL 轴与骨重塑

骨是人体至关重要的组织,它为每个组织提供内部的骨骼支持,骨骼形成并构建了人体的整体框架。骨也是造血细胞形成的地方和血液中钙浓度的

调节者。正是因为骨在人体中的重要性,需要不断补充以维持它的强度和结构完整性。这种补充就是骨重建,是由两种平衡对立的力量所控制的:成骨细胞控制的骨形成和破骨细胞控制的骨吸收。

骨重塑发生在骨表面,骨重塑贯穿生命过程的始终,是骨组织赖以适应外界环境的主要生物调控机制。根据 Parfit^[1] 的看法,骨重塑是骨吸收与骨形成的转变。成骨细胞和破骨细胞在一定时间内保持空间和时间上的协调稳定平衡关系,这种稳定的关系为骨形成提供了基础;最新的研究结果进一步揭示:成骨细胞、骨髓基质细胞与破骨细胞间协调稳定的关系是骨吸收与骨形成偶联的前提,在这一过程中 RANKL-RANK-OPG 轴起关键作用。

破骨细胞的成熟激活依赖 RANKL 的剂量性,而成骨细胞骨髓基质细胞可表达 OPG,OPG 不仅可以促进破骨细胞凋亡,还可以与 RANKL 竞争性结合 RANK,抑制破骨细胞生成,终止骨吸收。因此,RANKL-RANK-OPG 轴是骨重塑中骨吸收与骨形成保持动态平衡的关键。

4.2 遗传因素与骨质疏松和骨质疏松性骨折

遗传因素在骨量和骨强度的获得上也起着重要作用,虽然激素对骨代谢的调节很重要,钙摄入、运动和环境等对骨量也是不可忽视的因素,但在同一民族,同一地区、同一性别、同一年龄的人,骨量和骨强度也存在个体差异,一种基因的存在就决定一种性状,基因的多态性可使同类基因对同一信号出现不同程度的反应,结果也就引起不同程度性状的差异。有研究发现骨质疏松患者的亲属,无论男女都非常明显地低于对照组。另外一些研究发现,骨质疏松患者的女儿在绝经前骨量就明显低于正常母亲的女儿及绝经前参照人群的平均值,尽管不能完全排除饮食等生活习惯的影响,但仍高度提示骨矿含量有明显遗传相关性。有关双胞胎的研究显示遗传对身体不同部位骨量影响程度不同,影响程度从大到小依次为脊柱、股骨近端及前臂远端,呈向心性分布。随着年龄的增加,遗传影响减弱,而环境影响加强,两者存在相互消长的关系。骨质疏松的严重后果是骨质疏松性骨折,所以遗传因素也影响着骨质疏松性骨折,近年来越来越多的基因受到人们的关注,如维生素 D 受体基因、雌激素受体基因、胶原基因、护骨素基因等,在本研究中,利用 haploview 进行关联分析后发现 rs2460985、rs1805034、rs9525625 位点在 2 组人群中的差异具有统计学意义($P < 0.05$),OPG、RANK、RANKL 基因位点多态性对骨质

疏松性骨折有影响,发现 OPG、RANK、RANKL 基因和我们所研究的陕西关中汉族群体的 OF 发病率关联,说明遗传确实是骨质疏松的一个影响因素。

4.3 OPG-RANK-RANKL 系统基因的意义

绝经后雌激素水平的下降导致骨质疏松,动物和人体研究均显示:雌激素作用于成骨细胞或基质细胞上的雌激素受体 A,可引起细胞表达 OPG,雌激素缺乏时 OPG 表达降低而 RANKL 表达升高;如果补充雌激素可预防这种改变;补充雌激素可抑制 RANKL 对破骨细胞前体的影响^[2]。在老年性骨质疏松和药物诱导性骨质疏松中,RANKL-RANK-OPG 调节轴也起着重要作用。已经有动物和人体实验显示,在年龄增长的过程中骨组织、骨细胞的 OPG mRNA 表达降低,而 RANKL 表达升高;OPG 增加时,网状骨量也增加^[3,4]。

4.4 OPG-RANK-RANKL 系统基因的临床应用

骨质疏松症候选基因研究目前尚未应用于临床,但是其潜在性的应用表现在以下几个方面:

1)临床上对骨质疏松症的治疗目前尚无理想方法,预防性治疗是处理骨质疏松症最可靠的方式。因此,骨质疏松症候选基因的第一个潜在应用就是用来评估骨质疏松性骨折的危险性。如果能够分离并鉴定出 OF 高危因素和 SNP 位点基因多态性的关系,我们就可以以此作为工具,筛选高危人群,以便进行有效的预防。

2)不同基因多态性的个体对同一治疗方法有不同的敏感度。候选基因多态性的检测能够提供给患者合适的治疗方法的信息,以决定最佳治疗方法。

3)候选基因研究的深入,那些确定影响 OF 发生率和骨代谢作用的基因必将成为新药研发的首选

目标。

OPG 及该系统的其它成员对骨吸收增加的疾病具有治疗作用,这一观点已经被证实“给予成年小鼠 OPG 可使骨量增加;给予卵巢切除小鼠 OPG 可完全阻断骨量丢失”,在绝经后妇女中,使用单剂量 OPG 可以抑制破骨细胞的分化和活化,进而抑制骨吸收;OPG 在多发骨髓瘤和乳腺癌骨转移的治疗中也有较好疗效;OPG 与 PTH 联用治疗 PMO 也取得了较好的疗效,此外,RANK-Fc 融合蛋白对于抑制小鼠的骨吸收和恶性肿瘤的体液性高血钙具有治疗作用, Bekker 等 2001 年首次报道使用 OPG-Fc 融合蛋白单次皮下注射(3mg/kg)治疗绝经期后妇女的骨质疏松症,有效率达到 80%,而且疗效大于 3 周^[5]。相信很快,OPG 及其系统其他组分有成为治疗骨质吸收相关疾病理想药物的巨大潜能。

【参 考 文 献】

- [1] Parfitt AM. J cell Biochem,1994,55(3):273-28.
- [2] Michael Schoppet, Klans T. Preissner, Lorenz C. Hofbauer Rank Ligand and osteoprotegerin Paracrine Regulators of Bone Metabolism and Vascular Function. Arterioscler Thromb Vasc Bi-ol, 2002, 22(4): 549-553.
- [3] FU Gang, DU Jingyuan, YANG Shuhua, et al. The age-related decline of osteoprotegerin expressed by adult osteoblast cultured in vitro. Chin J Exp Surg,2001, 18(6):583-584.
- [4] Cao J, Venton L, Sakata T, et al. Expression of RANKL and OPG correlates with age-related bone loss in male C57BL/6 mice. J Bone Miner Res, 2003, 18(2):270-272.
- [5] Bekker PJ, Holloway D, Nakanishi A, et al. J Bone Miner Res, 2001; 16: 348-360.

(收稿日期: 2013-08-02)

骨质疏松性骨折与 OPG-RANK-RANKL 系统基因多态性的关联
分析

作者：[李天清](#)，[王金堂](#)，[马真胜](#)，[雷伟](#)，[王林](#)，[李萌](#)，[LI Tianqing](#)，[WANG Jintang](#)，[MA Zhensheng](#)，[LEI Wei](#)，[WANG Lin](#)，[LI Meng](#)

作者单位：[李天清, 马真胜, 雷伟, 王林, LI Tianqing, MA Zhensheng, LEI Wei, WANG Lin\(第四军医大学第一附属医院脊柱二科, 西安, 710032\)](#)，[王金堂, 李萌, WANG Jintang, LI Meng\(西安交通大学第一附属医院骨科, 西安, 710061\)](#)

刊名：[中国骨质疏松杂志](#) 

英文刊名：[Chinese Journal of Osteoporosis](#)

年，卷(期)：2014(3)

本文链接：http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201403006.aspx