

· 论著 ·

## 绝经前后妇女 OPG 基因多态性与骨密度相关性研究

商敏\* 蔺莉

首都医科大学附属北京友谊医院妇产科 100050

中图分类号: R68 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015) 09-1044-04

**摘要:** **目的** 分析 OPG 基因的单核苷酸多态性(SNP)与绝经前后妇女骨密度的关系。**方法** 在 235 名绝经前后妇女中,采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术对 6 个护骨素(OPG)基因的 SNP 进行分型。应用双能 X 线骨密度仪测定腰椎、髋部和股骨颈骨密度(BMD)。**结果** rs6993813TT 基因型股骨颈 BMD 显著高于 CC 型,CC 型各部位的 BMD 均低于 TC/TT 型( $P < 0.05$ )。rs4355801GG 型股骨颈的 BMD 高于 AG/AA 型( $P < 0.05$ )。rs1032129 AA 型股骨颈的 BMD 高于 AC/CC 型( $P < 0.05$ )。rs2073618 的 CC 基因型股骨颈的 BMD 显著高于 GG/GC 型( $P < 0.05$ )。**结论** rs6993813, rs4355801, rs1032129 和 rs2073618 均与中国绝经前后女性 BMD 有关,其危险基因分别为 C, A, C 和 G,而 T, G, A 和 C 则具有保护作用,含有保护基因者骨密度高于含有危险基因者,但确切的机制尚需在今后工作中进一步研究阐明。

**关键词:** 护骨素;单核苷酸多态性;骨密度;骨质疏松

## Association of genetic polymorphism of OPG and bone mineral density in pre- and post-menopausal women

SHANG Min, LIN Li

Department of Obstetrics and Gynecology, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

Corresponding author: SHANG Min, Email: shangmin917@126.com

**Abstract: Objective** To explore the relationship between single nucleotide polymorphism (SNP) of osteoprotegerin (OPG) and bone mineral density (BMD) in pre-and post-menopausal women. **Methods** A cross-sectional study was conducted in 108 premenopausal and 127 postmenopausal women. Six genotypes of OPG were determined using chip-based matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. BMD of the lumbar spine, hip, and the femoral neck was evaluated using dual energy X-ray absorptiometry. **Results** BMD of the femoral neck in SNP rs6993813TT patients was significantly higher than that in TC/CC type patients ( $P < 0.05$ ). BMD of all parts in CC type patients was lower than that in TC/TT patients. BMD of the femoral neck in SNP rs4355801GG patients was significantly higher than that in AG/AA type patients ( $P < 0.05$ ). BMD of the femoral neck in SNP rs1032129AA patients was significantly higher than that in AC/CC type patients ( $P < 0.05$ ). BMD of the femoral neck in SNP rs2073618CC patients was significantly higher than that in GG/GC type patients ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The observed risk alleles of rs6993813, rs4355801, rs1032129, and rs2073618 in the present study were C, A, C, and G, respectively. By contrast, the protective alleles were T, G, A, and C, respectively. Women with protective alleles had higher BMD than women with risk alleles. The detailed mechanism needs further work to clarify.

**Key words:** OPG, Polymorphism; Bone mineral density; Osteoporosis

骨质疏松症是一种严重影响绝经妇女健康的常见的多基因疾病,遗传因素在其发病中发挥重要作用。近年发现核因子  $\kappa$ B 受体活化子配体(RANKL)、核因子  $\kappa$ B 受体活化子(RANK)以及护骨素(OPG)<sup>[1-4]</sup>是调节骨代谢的重要分子机制。

OPG 可阻断 RANKL 与 RANK 之间的相互作用,抑制破骨细胞生成、活化,促使 OC 凋亡。因此,OPG 基因是又一个骨质疏松候选基因,本研究对 OPG 基因 5 个单核苷酸多态性(SNP)与绝经前后妇女骨密度(BMD)的关系进行了研究。

## 1 对象和方法

## 1.1 研究对象

\*通讯作者:商敏,Email: shangmin917@126.com

共有 235 例就诊于我院更年期门诊的绝经前后的妇女被纳入本研究,年龄  $51.5 \pm 3.3$  (43 - 65) 岁,停经年限 (YSM)  $3.6 \pm 3.2$  年。排除患有各种可能影响骨代谢的疾病和正在服用可能影响骨代谢的药物者。

## 2 方法

### 2.1 骨密度 (BMD) 测定

用美国 Hologic Discovery-W (Bedford, MA) 双光能 X 线骨密度仪 (DXA) 测量每例受试者腰椎正位和股骨近端 BMD。根据世界卫生组织的定义,研究个体的骨密度低于同性别峰值骨量的 2.5SD 以上,定为骨质疏松, BMD 低于同性别峰值骨量的 1 ~ 2SD 之间为骨量减少,前两者共同归入低骨量组, BMD 较同性别峰值骨量的降低  $< 1SD$  归入正常骨量组。

### 2.2 OPG 基因 SNP 的检测

(1) DNA 抽提: 从外周血中采用 DNA 提取试剂盒 (天真公司) 提取。(2) rs6993813, rs3102735, rs2073618, rs6469804, rs4355801 和 rs1032129 的 PCR 引物和单碱基延伸引物都是用 Assay Designer 软件包设计。SNP 分型是由上海邃志生物科技有限公司利用美国 Sequenom 公司的 MassARRAY 系统完成,该系统基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术 (MALDI-TOF)。所有需要分型的 DNA 样本都稀释到 5 ng/ul, 取 1 ul DNA 样本, 将其与 0.95 ul 水、0.625 ul PCR 缓冲液、1 ul 的 2.5 mM dNTP、0.325 ul 的 25 mM MgCl<sub>2</sub>、1 ul PCR 引物以及 0.1 ul HotStar Taq 酶混合在一起。PCR 反应条件: 94°C 15 min; 94°C 20 秒, 56°C 30 秒, 72°C 1 min, 共 45 个循环; 最终 72°C 3 min。PCR 扩增后, 剩余的 dNTP 将被去磷酸消化掉, 反应体系包括 1.53 ul 水、0.17 ul SAP 缓冲液、0.3 单位碱性磷酸酶。该反应在 37°C 进行 40 min, 然后 85°C 5 min 使酶失活。碱性磷酸酶处理后, 针对 SNP 的单碱基延伸引物在下列反应体系中进行: 0.755 ul 水、0.2 ul 10X iPLEX 缓冲液、0.2 ul 终止混合物、0.041 ul iPLEX 酶、0.804 ul 10 uM 的延伸引物。单碱基延伸反应在下列条件下进行: 94°C 30 秒; 94°C 5 秒, 52°C 5 秒, 80°C 5 秒 5 个循环, 共 40 个循环; 最后 72°C 3 min。在终止反应物中加入 6mg 阳离子交换树脂脱盐, 混合后加入 25ul 水悬浮。使用 MassARRAY Nanodispenser 将最终的分型产物点样到一块 384 孔的 spectroCHIP 上, 并用 MALDI-TOF 进行分析。最终结果由 MassARRAY RT 软件系统实时读取, 并由

MassARRAY Typer 软件系统完成基因分型分析。

### 2.3 统计学处理

采用 SPSS 11.5 软件, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 基因型频率分布比较采用  $\chi^2$  检验。不同基因型间比较采用单因素方差检验 (ANOVA) 以及协方差检验, 多组间两两比较采用 LSD 法。单倍体型和疾病的关系采用 Haploview 4.1 软件进行分析。

## 2 结果

### 2.1 受试者一般资料

在 235 例入组的患者中 127 例为绝经后患者, 108 例为围绝经期 (出现围绝经期症状但停经不足 12 月) 患者。骨量减少和骨质疏松患者分别为 62 (26.4%) 例和 6 (2.6%) 例, 二者合称为低骨量患者。

### 2.2 正常和低骨量患者的 OPG 基因型和单倍体型分布

我们成功的对所有患者的 6 个 SNP 进行了分型。这 6 个 SNP 均符合 Hardy-Weinberg 平衡 ( $P > 0.05$ ), 其基因型在低骨量和正常骨量人群中的分布没有差异。Haploview 发现 2 个单倍体型, 但未发现该单倍体型与低骨量有关。

### 2.3 OPG 各 SNP 不同基因型的校正后 BMD

本研究发现 rs6993813, rs2073618, rs4355801, rs1032129 与 BMD 有关 ( $P < 0.05$ ), 在对体重和绝经年限进行校正后仍是如此 (表 1)。而 rs3102735 和 rs6469804 和任何部位的 BMD 均无关。

rs6993813 位于 OPG 上游, TT 型各部位的 BMD 均高于 TC 和 CC 型, 其中髌部和股骨颈部位与 CC 型相比差异具有统计学意义。CC 型各部位的 BMD 均低于 TC/TT 型 ( $P < 0.05$ )。rs2073618 的 CC 基因型各部位的 BMD 均高于 GG 和 GC 基因型, CC 型股骨颈的 BMD 高于 GG/GC 型 ( $P < 0.05$ )。rs4355801 GG 型各部位的 BMD 均高于 AA 和 AG 型, 其中股骨颈部位与 AA/AG 型相比差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。rs1032129 AA 型股骨颈的 BMD 高于 AC/CC 型 ( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

BMD 是骨质疏松最重要的表型之一, 可用于评估骨折的风险, 最近《新英格兰医学杂志》上发表的一篇文章, 专门研究了 BMD 和基因的关系, 鉴别出与骨质疏松有关的基因序列<sup>[2]</sup>。研究者们将 5861 个冰岛人作为发现组, 将 4164 个冰岛人、2269 个丹

表1 OPG多态性和体重年龄校正后BMD关系

Table 1 The relationship between OPG SNPs and BMD adjusted by body weight and ages

OPG	p			p( dominant)			p( recessive)	
rs3102735	TT(n=175)	TC(n=52)	CC(n=8)	TT vs CC	TT vs TC	CC vs TC		
腰椎(g/cm <sup>2</sup> )	0.974 ± 0.010	0.954 ± 0.019	0.954 ± 0.048	1.000	1.000	1.000	0.314	0.746
髌部(g/cm <sup>2</sup> )	0.895 ± 0.009	0.885 ± 0.017	0.837 ± 0.042	0.538	1.000	0.881	0.349	0.192
股骨颈(g/cm <sup>2</sup> )	0.779 ± 0.008	0.783 ± 0.014	0.729 ± 0.036	0.522	1.000	0.508	0.793	0.166
rs2073618	GG(n=107)	GC(n=113)	CC(n=15)	GG vs CC	GG vs GC	CC vs GC		
腰椎(g/cm <sup>2</sup> )	0.970 ± 0.013	0.959 ± 0.013	1.028 ± 0.034	0.354	1.000	0.190	0.887	0.077
髌部(g/cm <sup>2</sup> )	0.882 ± 0.011	0.896 ± 0.011	0.927 ± 0.031	0.504	1.000	1.000	0.258	0.228
股骨颈(g/cm <sup>2</sup> )	0.761 ± 0.010	0.789 ± 0.010	0.820 ± 0.026	0.115	0.136	0.829	0.019	0.105
rs1032129	CC(n=68)	CA(n=126)	AA(n=41)	CC vs AA	CC vs CA	AA vs CA		
腰椎(g/cm <sup>2</sup> )	0.967 ± 0.016	0.961 ± 0.012	0.997 ± 0.021	0.734	1.000	0.381	0.875	0.132
髌部(g/cm <sup>2</sup> )	0.876 ± 0.014	0.891 ± 0.011	0.916 ± 0.019	0.258	1.000	0.731	0.207	0.138
股骨颈(g/cm <sup>2</sup> )	0.753 ± 0.012	0.786 ± 0.009	0.798 ± 0.016	0.079	0.094	1.000	0.014	0.185
rs4355801	AA(n=107)	AG(n=111)	GG(n=17)	AA vs GG	AA vs AG	GG vs AG		
腰椎(g/cm <sup>2</sup> )	0.966 ± 0.013	0.964 ± 0.013	1.014 ± 0.033	0.530	1.000	0.471	0.799	0.151
髌部(g/cm <sup>2</sup> )	0.879 ± 0.011	0.899 ± 0.011	0.918 ± 0.029	0.620	0.647	1.000	0.146	0.328
股骨颈(g/cm <sup>2</sup> )	0.760 ± 0.010	0.792 ± 0.010	0.805 ± 0.025	0.268	0.059	1.000	0.011	0.258
rs6993813	CC(n=81)	CT(n=122)	TT(n=32)	TT vs CC	TT vs TC	CC vs TC		
腰椎(g/cm <sup>2</sup> )	0.967 ± 0.015	0.958 ± 0.012	1.013 ± 0.024	0.259	0.119	1.000	0.883	0.043
髌部(g/cm <sup>2</sup> )	0.875 ± 0.013	0.891 ± 0.011	0.935 ± 0.021	0.044	0.169	1.000	0.126	0.024
股骨颈(g/cm <sup>2</sup> )	0.761 ± 0.011	0.780 ± 0.009	0.820 ± 0.018	0.017	0.140	0.568	0.052	0.014
rs6469804	AA(n=131)	AG(n=95)	GG(n=9)	AA vs GG	AA vs AG	GG vs AG		
腰椎(g/cm <sup>2</sup> )	0.974 ± 0.012	0.956 ± 0.014	1.028 ± 0.044	0.712	0.921	0.356	0.497	0.173
髌部(g/cm <sup>2</sup> )	0.887 ± 0.010	0.892 ± 0.012	0.939 ± 0.040	0.605	1.000	0.776	0.540	0.214
股骨颈(g/cm <sup>2</sup> )	0.768 ± 0.009	0.787 ± 0.010	0.840 ± 0.034	0.125	0.471	0.429	0.073	0.067

麦人和1491个澳大利亚人作为复制组,研究了与腰椎和髌关节BMD可能相关的301019个SNP,结果发现有5个基因区域与BMD密切相关,其中3个区域和骨的活性联系尤为紧密:即RANKL, OPG和雌激素受体1(ESR1)基因。OPG上的两个SNPs, rs6469804和rs6993813,与腰椎和髌部的BMD有关,且二者连锁不平衡。根据欧洲西北部的Utah的HapMap数据,研究最多的G1181→C(rs2073618)和T950→C(rs2073617)均与这两个SNP连锁不平衡。迄今为止包含研究最多的荟萃分析对来自欧洲和亚洲东部32,961个个体的17项全基因组关联研究(GWAS)进行分析发现,56个位点与腰椎和股骨颈BMD有关<sup>[5]</sup>,其中有三条分子学通道与其关系最为密切,即RANK-RANKL-OPG,间充质干细胞分化通道和Wnt信号通道。尽管这些分子通道似乎对BMD和骨转换具有重要作用,但这一结论仍需在不同的人群中进行研究加以证实。

我们的研究发现,rs6993813与腰椎、髌部和股骨颈的BMD均有关,rs4355801与股骨颈的BMD有关,rs1032129与股骨颈的BMD有关。rs2073618是OPG基因第一外显子编码信号肽的SNP中唯一的非同义突变<sup>[6]</sup>。该突变导致第三个氨基酸由赖氨

酸Lys(AAG)变成了天冬酰胺Asn(AAC),本研究发现CC型各部位BMD均高于GG型,对年龄和体重进行校正后CC型股骨颈的BMD仍高于GG/GC型( $P < 0.05$ ),提示OPG基因的CC型对绝经后妇女股骨颈BMD具有一定的保护作用,并且这种作用不受年龄和体重的影响,与既往研究相同<sup>[1,6-8]</sup>,进一步有力的证实了二者之间的相关性。已有一些研究对关于该基因多态性与BMD相关性的机制进行了探讨,赖氨酸是一种必需氨基酸,而天冬酰胺是一种极性氨基酸,在另一种分泌型蛋白—血管紧张素原中,信号肽中的必需氨基酸变化会影响其分泌动力学<sup>[9]</sup>。编码OPG信号肽区域的这个点突变是否同样也会影响到OPG的分泌动力学或OPGmRNA的表达,还有待于在今后的功能研究方面去证实。本研究中rs6993813, rs4355801, rs1032129和rs2073618的危险基因分别为C, A, C和G,与既往研究结果相似<sup>[2]</sup>,其频率分别为60.4%, 69.1%, 55.7%和69.6%明显低于欧洲人群<sup>[2]</sup>,而与中国上海的汉族人群相似<sup>[10]</sup>。国外研究发现rs3102735与反应骨强度的应力-应变指数相关<sup>[11,12]</sup>。但是在我们的研究中未发现rs6469804或rs3102375与BMD的相关性。

综上所述,在 OPG 基因的 rs6993813, rs4355801, rs1032129 和 rs2073618 均与中国绝经前后女性 BMD 有关,并且不受年龄和体重的影响,但确切的机制尚需进一步研究阐明。

### 【 参 考 文 献 】

- [ 1 ] Richards JB, Rivadeneira F, Inouye M, et al. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *Lancet*, 2008, 371(9623):1505-12.
- [ 2 ] Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, et al. Multiple genetic loci for bone mineral density and fractures. *New England Journal of Medicine*, 2008, 358(22):2355-65.
- [ 3 ] Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, et al. New sequence variants associated with bone mineral density. *Nat Genet*, 2009, 41(1):15-7.
- [ 4 ] Paternoster L, Ohlsson C, Sayers A, et al. OPG and RANK polymorphisms are both associated with cortical bone mineral density: findings from a metaanalysis of the Avon longitudinal study of parents and children and gothenburg osteoporosis and obesity determinants cohorts. *J Clin Endocrinol MeTab*, 2010, 95(8):3940-8.
- [ 5 ] Estrada K, Styrkarsdottir U, Evangelou E, et al. Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nat Genet*, 2012, 44: 491-501.
- [ 6 ] Langdahl BL, Carstens M, Stenkjaer L, et al. Polymorphisms in

the osteoprotegerin gene are associated with osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res*, 2002, 17(7):1245-55.

- [ 7 ] Zhao HY, Liu JM, Ning G, et al. The influence of Lys3Asn polymorphism in the osteoprotegerin gene on bone mineral density in Chinese postmenopausal women. *Osteoporosis International*, 2005, 16(12):1519-24.
- [ 8 ] Arko B, Prezelj J, Kocijancic A, et al. Association of the osteoprotegerin gene polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal women. *Maturitas*. 2005, 51(3):270-9.
- [ 9 ] Nakajima T, Cheng T, Rohrwasser A, et al. Functional analysis of a mutation occurring between the two in-frame AUG codons of human angiotensinogen. *J Biol Chem*, 1999, 274: 35749-55.
- [ 10 ] Liu JM, Zhang MJ, Zhao L, et al. Analysis of Recently Identified Osteoporosis Susceptibility Genes in Han Chinese Women. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2010, 95(9): E112-E20.
- [ 11 ] Roshandel D, Holliday KL, Pye SR, et al. Influence of Polymorphisms in the RANKL/RANK/OPG Signaling Pathway on Volumetric Bone Mineral Density and Bone Geometry at the Forearm in Men. *Calcified Tissue International*, 2011, 189:446-455.
- [ 12 ] Roshandel D, Thomson W, Pye SR, et al. Polymorphisms in genes involved in the NF- $\kappa$ B signalling pathway are associated with bone mineral density, geometry and turnover in men. *PLoS One*, 2011, 6:e28031.

(收稿日期:2014-10-14)

### (上接第 1043 页)

- [ 14 ] 王永刚,张振东,郭进修. 壮骨汤治疗原发性骨质疏松症 27 例报告. *中药正骨*, 2002, 14(5)33.  
Wang Yonggang, Zhang Zhendong, Guo Xiujin. 27 case reports of Bushenzhuangutang in primary osteoporosis, *Traditional Chinese Medicine in Bonesetting*, 2002, 14(5)33.
- [ 15 ] 马寄晓,刘秀杰主编:实用临床核医学. 原子能出版社, 2002, 5, 第 1 版, 516-521.  
Ma jixiao, Liu xiujie: *Practical clinical nuclear medicine*. Atomic energy press, 2002, 5, first edition, 516-521.
- [ 16 ] 黄建敏,潘莉萍,李冬雪,等.  $^{99}\text{TcMDP}$  治疗强直性脊柱炎的疗效观察. *中华核医学杂志*, 2005, 25(3):174-175.  
Huang jianmin, Pan liping, Li dongxue, et al. Therapeutic effect of  $^{99}\text{TcMDP}$  in the treatment of ankylosing spondylitis. *Chin J Nucl med*, 2005, 25(3):174-175.
- [ 17 ] 张允平,杨维淮,叶新华,等. “云克”与泼尼松治疗 Graves 眼病疗效比较. *中华核医学杂志*, 2002, 22(4):204-205.  
Zhang yunping, Yang weihui, Ye weixin, et al. Evaluation of the therapeutic effectiveness of “yunke” and prednisone on Graves’ disease. *Chin J Nucl Med*, 2002, 22(4):204-205.

- [ 18 ] 王勇平,李晓琴,张辉,等. 塑料包埋结合四环素荧光标记制作不脱钙骨组织切片的实验研究. *临床与实验病理学杂志*, 2012, 28(5):543-545.  
Wang yongping, Li xiaoqing, Zhanghui, et al. Research on plastic embedding combined with tetracycline fluorescence labeling in undecalcified bone tissue. *Chin J Clin Expe Path*, 2012, 28(5):543-545.
- [ 19 ] 李恩,陶静华,刘和娣,等. 补肾方药治疗骨质疏松的实验研究与临床观察. *中国骨质疏松杂志*, 1996, 2(4):65.  
Li En, Tao Jinghua, Liu Hedi, et al. Experimental study and clinical observation of osteoporosis treatment with kidney replenishing herbs. *Chin J Osteoporos*, 1996, 2(4):65.
- [ 20 ] 丁桂芝,刘忠厚,周勇. 中西医结合防治骨质疏松症的基础与临床研究进展. *中国骨质疏松杂志*, 1997, 3(2):81-84.  
Ding guizhi, Liu houzhong, Zhou yong. Combined use of traditional chinese medicine and western medicine in treating osteoporosis. *Chin J Osteoporos*, 1997, 3(2):81-84.

(收稿日期:2014-11-27)