

· 论 著 ·

绝经前后妇女 RANK 基因多态性与骨密度相关性的研究

商敏* 蔺莉

首都医科大学附属北京友谊医院妇产科, 北京 100050

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015) 11-1303-04

摘要: 目的 分析 RANK 基因的单核苷酸多态性(SNP)与绝经前后妇女骨密度(BMD)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三个 RANK 基因的 SNP 进行分型。应用双能 X 线骨密度仪测定腰椎和股骨颈 BMD。结果 rs3018362 的 AA/AG 基因型 BMD 显著高于 GG 型($P < 0.05$),rs180503 的 TT 基因型在低骨量患者中占 63.6%,而在正常骨量人群中仅占 39.5% ($P < 0.05$),提示其可能与峰值骨量有关。结论 RANK 基因多态性与中国绝经前后妇女 BMD 有关,但仍需大样本研究证实。

关键词: RANK; 单核苷酸多态性; 骨密度; 骨质疏松

Association of genetic polymorphisms of RANK and bone mineral density in Chinese peri- and postmenopausal 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 influence of 3 single nucleotide polymorphisms of receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) in bone mineral density (BMD) in a Chinese female population. **Methods** A cross-sectional study was conducted in 108 perimenopausal and 127 postmenopausal women. All participants underwent lumbar spinal and nondominant femoral BMD evaluation using dual energy X-ray absorptiometry. Three genotypes of RANK were determined by the chip-based matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Results** BMD in rs3018362 AA/AG genotype of RANK was significantly higher than that in GG genotype. The percentage of rs180503 TT genotype was 63.6% in low BMD patients, but was 39.5% in normal bone mass population, indicating that it was associated with peak bone mass. **Conclusion** RANK genetic polymorphisms influence BMD in peri- and postmenopausal Chinese women. This needs further confirmation by large sample study.

Key words: RANK; Single nucleotide 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 κ B 受体活化因子配体(RANKL)、核因子 κ B 受体活化因子(RANK)以及护骨素(OPG)^[1-4]是调节生成、融合、存活、活化和凋亡的重要分子机制。RANKL 与 RANK 结合后,激活 OC 分化、成熟,增加成熟 OC 活性,抑制 OC 凋亡,而 OPG 则可阻断 RANKL 与 RANK 之间的相互作用。RANK、RANKL 和 OPG 基因均是骨质疏松候选基因。国内外对 OPG 基因多态性与 BMD 的关系已进行了大量研究,而对 RANK 与 BMD 的关系知之甚少,因此,本研究对 RANK 基因 3 个单核苷酸多态性

(SNP)与绝经前后妇女 BMD 的关系进行了研究。

1 资料和方法

1.1 研究对象

共有 235 例就诊于首都医科大学附属北京友谊医院更年期门诊的绝经前后妇女被纳入本研究,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。

1.2 方法

1.2.1 骨密度(BMD)测定: 用美国 Hologic Discovery-W 双光能 X 线骨密度仪(DXA)测量每例受试者腰椎正位、股骨近端 BMD。仪器由专人操作。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

*通讯作者: 商敏, Email: shangmin917@126.com

松, BMD 低于同性别峰值骨量的 1 ~ 2.5SD 之间为骨量减少, 以上二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。

1.2.2 RANK 基因 SNP 的基因型分型: (1) DNA 提取: 从外周血中采用 DNA 提取试剂盒提取。 (2) rs1805034, rs3018362 和 rs12458117 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, 该系统是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/ μ l, 取 1 μ l DNA 样本, 将其与 0.95 μ l 水、0.625 μ l PCR 缓冲液 (含 15 mmol/L $MgCl_2$)、1 μ l 的 2.5 mmol/L dNTP、0.325 μ l 的 25 mmol/L $MgCl_2$ 、1 μ l PCR 引物以及 0.1 μ l HotStar Taq 酶 (Qiagen) 混合在一起。 PCR 反应条件: 94 $^{\circ}C$ 15 分钟; 94 $^{\circ}C$ 20 秒, 56 $^{\circ}C$ 30 秒, 72 $^{\circ}C$ 1 分钟, 共 45 个循环; 最终 72 $^{\circ}C$ 3 分钟。 PCR 扩增后, 剩余的 dNTP 将被去磷酸消化掉, 反应体系包括 1.53 μ l 水、0.17 μ l SAP 缓冲液、0.3 单位碱性磷酸酶。 该反应在 37 $^{\circ}C$ 进行 40 分钟, 然后 85 $^{\circ}C$ 5 分钟使酶失活。 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 μ l 水、0.2 μ l 10X iPLEX 缓冲液、0.2 μ l 终止混合物、0.041 μ l iPLEX 酶、0.804 μ l 10 μ mol/L 的延伸引物。 单碱基延伸反应在下列条件下进行: 94 $^{\circ}C$ 30 秒; 94 $^{\circ}C$ 5 秒, 52 $^{\circ}C$ 5 秒, 80 $^{\circ}C$ 5 秒 5 个循环, 共 40 个循环; 最后 72 $^{\circ}C$ 3 分钟。 在终止反应物中加入 6 mg 阳离子交换树脂脱盐, 混合后加入

25 μ l 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。

1.2.3 统计学处理: 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 基因型频率分布比较采用 χ^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。 以上分析采用 SPSS 11.5 软件。 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 患者一般资料

在 235 例入组的患者中 127 例为绝经后患者, 108 例为围绝经期患者。 入组患者年龄 51.5 ± 3.3 (43 ~ 65) 岁, 绝经年限 (YSM) 为 2.1 ± 2.9 年。

2.2 正常和低骨量患者 RANK 基因 3 个 SNP 各基因型和单倍体型的分布

本研究成功的对 235 例患者的 rs3018362 和 rs1805034 以及 229 例患者的 rs12458117 进行了分型。 这 3 个 SNP 均符合 Hardy-Weinberg 平衡 ($P > 0.05$)。 在绝经前女性中, rs1805034 的 TT 基因型在低骨量患者中占 63.6%, 而在正常骨量人群中仅占 39.5% ($P < 0.05$, 见表 1), 似然比 (95% 可信区间) 为 0.374 (0.142 - 0.986)。 但在绝经后人群中并未发现这一现象。 Haploview 发现 1 个单倍体型, 但未发现该单倍体型与低骨量有关。

表 1 低骨量与正常骨量患者 RANK 基因 SNP 基因型的分布

Table 1 Distribution of SNP genotype of RANK in low bone mass and normal bone mass patients.

SNP	基因型	总体			围绝经期			绝经后		
		低骨量组	正常组	P	低骨量组	正常组	P	低骨量组	正常组	P
rs1805034	TT	32 (0.444)	66 (0.405)	0.571	14 (0.636)	34 (0.395)	0.042	18 (0.360)	32 (0.416)	0.531
	CC + CT	40 (0.556)	97 (0.595)		8 (0.364)	52 (0.605)		32 (0.640)	45 (0.584)	
rs12458117	GG	37 (0.536)	67 (0.419)	0.101	9 (0.409)	34 (0.410)	0.996	28 (0.596)	33 (0.429)	0.071
	AG + AA	32 (0.464)	93 (0.581)		13 (0.591)	49 (0.590)		19 (0.404)	44 (0.571)	
rs3018362	AA	42 (0.583)	79 (0.485)	0.163	16 (0.727)	43 (0.500)	0.056	26 (0.520)	36 (0.468)	0.811
	AG + GG	30 (0.417)	84 (0.515)		6 (0.273)	43 (0.500)		24 (0.480)	41 (0.532)	

3 RANK 多态性和体重、年龄校正后 BMD 的关系

本研究发现 rs3018362 AA 型股骨颈的 BMD 显

著低于 AG 型 ($P < 0.05$), 在对体重和绝经年限进行校正后仍是如此 (表 2)。 而 rs1805034 和 rs12458117 与任何部位的 BMD 均无关。

表 2 RANK 基因 3 个 SNP 各基因型患者的校正 BMD

Table 2 Adjusted BMD in 3 SNP genotype patients.

RANK	P			P(显性)		P(隐性)		
rs12458117	GG(n=104)	AG(n=107)	AA(n=18)	AA vs GG	AA vs AG	GG vs AG		
腰椎 (g/cm ²)	0.968 ± 0.013	0.974 ± 0.013	0.983 ± 0.032	1	1	1	0.541	0.718
髌部 (g/cm ²)	0.898 ± 0.012	0.885 ± 0.012	0.915 ± 0.029	1	1	1	0.802	0.44
股骨颈 (g/cm ²)	0.779 ± 0.010	0.776 ± 0.025	0.782 ± 0.010	1	1	1	0.609	0.876
rs1805034	TT(n=98)	CT(n=113)	CC(n=24)	TT vs CC	TT vs TC	CC vs TC		
腰椎 (g/cm ²)	0.969 ± 0.014	0.977 ± 0.013	0.929 ± 0.027	0.578	1	0.358	0.912	0.131
髌部 (g/cm ²)	0.901 ± 0.012	0.887 ± 0.011	0.874 ± 0.024	0.978	1	1	0.249	0.45
股骨颈 (g/cm ²)	0.779 ± 0.010	0.781 ± 0.010	0.767 ± 0.021	1	1	1	0.52	0.572
rs3018362	AA(n=121)	AG(n=98)	GG(n=16)	AA vs GG	AA vs AG	GG vs AG		
腰椎 (g/cm ²)	0.954 ± 0.012	0.993 ± 0.013	0.931 ± 0.033	1	0.091	0.249	0.079	0.241
髌部 (g/cm ²)	0.883 ± 0.011	0.904 ± 0.012	0.875 ± 0.030	1	0.554	1	0.263	0.572
股骨颈 (g/cm ²)	0.764 ± 0.009	0.802 ± 0.010	0.745 ± 0.025	1	0.019	0.111	0.026	0.171

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,为了明确近年发现并提出的诸多骨质疏松候选基因的真正作用,美国的学者们于 2006 年对 20 个基因进行了大规模高密度的 SNP 筛查。对来自 405 个白人核心家族的 1873 个个体的 20 个基因的 27 个 SNPs(密度为 snp/4kb)与三个重要的骨骼部位:脊柱、髌部和桡骨远端的定量特征 BMD 和定性特征骨质疏松(OP)之间的相关性进行了研究,结果发现 RANK 等四个基因与脊柱、髌部及桡骨远端 BMD/OP 高度相关,按性别分别进行分析这些关系仍然存在,结果提示 RANK 在众多骨质疏松候选基因中优先发挥作用^[5]。

RANK 是 RANKL 唯一的受体,能够通过 RANKL 诱发破骨信号的传导。RANK 缺乏的小鼠表现为严重的骨硬化。许多研究已提示 RANK 调节骨代谢的重要作用以及其与 BMD 的关系^[1,3,6-10]。导致单链构象多态性(SSCP)变化的 rs1805034(即 575 T>C 或 Val192Ala)^[7]最先被报道与朝鲜绝经后女性的 BMD 有关^[10]。但在国内的研究中该多态性仅与男性髌部 BMD 有关而与女性 BMD 无关^[3]。在本项研究中,在绝经前女性中,rs1805034 的 TT 基因型在低骨量患者中和正常骨量人群中分布存在显著性差异($P < 0.05$),但在绝经后人群中并未发现这一现象,提示其可能主要影响峰值骨量。

最近的全基因组相关分析(GWAS)研究发现位于 RANK 下游 27kb 的 rs3018362 与 BMD 有关^[1,2,4,10]。本研究也证实 rs3018362 与体重和年龄校正的股骨颈 BMD 有关,GG 基因型的 BMD 低于 AA/AG(见表 2),而与腰椎和髌部 BMD 无关,提示

rs3018362 主要影响股骨颈 BMD。本研究的样本中各基因型的分布与欧洲不同^[1],而与国内的其他研究相似^[11],可能与种族差异有关。但与上海学者研究中 A 为危险等位基因不同,本研究发现 G 是低骨量的危险等位基因^[11],可能与中国地域广泛,南北方人种间差异有关,需要多中心大样本研究进一步分析 rs3018362 与 BMD 的关系。此外,本研究发现 rs3018362 仅可以解释大约 5.5% 的 BMD 的变异,这可能是由于骨质疏松是一种多基因遗传病,许多不同的基因参与其发病,因此每种基因的作用仅占其中的一小部分。

对朝鲜人的研究发现内含子 6 中的 + 34863G > A(rs12458117)与腰椎和股骨近端 BMD 有关,有可能是低 BMD 的遗传因子^[9],因此本研究也对其进行了分析,但未发现该 SNP 与围绝经期及绝经后妇女的任何部位的 BMD 有关。

综上所述,本研究对北京市绝经前后女性的横断面研究发现 RANK 基因的 rs3018362 与绝经前后妇女的股骨颈 BMD 有关,AA/AG 型对绝经前后妇女股骨颈 BMD 具有一定的保护作用,并且不受年龄和体重的影响,rs1805034 则与峰值骨量有关,需要进一步大样本的研究加以证实,其中但确切的机制尚需在今后工作中进一步研究阐明。

【参 考 文 献】

- [1] Stykarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, et al. Multiple genetic loci for bone mineral density and fractures[J]. New England Journal of Medicine. 2008,358(22):2355-65.
- [2] Stykarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, et al. New sequence variants associated with bone mineral density[J]. Nat Genet. 2009,41(1):15-7.
- [3] Hsu YH, Niu TH, Terwedow HA, et al. Variation in genes

- involved in the RANK/RANKL/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men[J]. *Human Genetics*. 2006,118(5):568-77.
- [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]. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010,95(8):3940-8.
- [5] Xiong DH, Shen H, Zhao LJ, et al. Robust and comprehensive analysis of 20 osteoporosis candidate genes by very high-density single-nucleotide polymorphism screen among 405 white nuclear families identified significant association and gene-gene interaction[J]. *J Bone Miner Res*. 2006, 21(11):1678-95.
- [6] Roshandel D, Holliday KL, Pye SR, et al. Genetic Variation in the RANKL/RANK/OPG Signaling Pathway Is Associated With Bone Turnover and Bone Mineral Density in Men[J]. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2010,25(8):1830-8.
- [7] Wuyts W, Van Wesenbeeck L, Morales-Piga A, et al. Evaluation of the role of RANK and OPG genes in Paget's disease of bone[J]. *Bone*. 2001,28(1):104-7.
- [8] Kim JG, Kim JH, Kim JY, et al. Association between osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor-kappa B (RANK), and RANK ligand (RANKL) gene polymorphisms and circulating OPG, soluble RANKL levels, and bone mineral density in Korean postmenopausal women [J]. *Menopause-the Journal of the North American Menopause Society*. 2007,14(5):913-8.
- [9] Koh JM, Park BL, Kim DJ, et al. Identification of novel RANK polymorphisms and their putative association with low BMD among postmenopausal women [J]. *Osteoporosis International*. 2007, 18(3):323-31.
- [10] Choi JY, Shin A, Park SK, et al. Genetic polymorphisms of OPG, RANK, and ESR1, and bone mineral density in Korean postmenopausal women [J]. *Calcified Tissue International*. 2005,77(3):152-9.
- [11] Liu J-m, Zhang M-j, Zhao L, et al. Analysis of Recently Identified Osteoporosis Susceptibility Genes in Han Chinese Women [J]. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2010, 95(9):E112-E20.

(收稿日期: 2012-09-08)

(上接第 1302 页)

- [63] MARIN P J, RHEA M R. Effects of vibration training on muscle strength: a meta-analysis [J]. *Journal of strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association*, 2010, 24(2): 548-56.
- [64] CHEN C H, LIU C, CHUANG L R, et al. Chronic effects of whole-body vibration on jumping performance and body balance using different frequencies and amplitudes with identical acceleration load [J]. *Journal of science and medicine in sport / Sports Medicine Australia*, 2014, 17(1): 107-12.
- [65] OSAWA Y, OGUMA Y, ISHII N. The effects of whole-body vibration on muscle strength and power: a meta-analysis [J]. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*, 2013, 13(3): 380-90.
- [66] GILSANZ V, WREN T A, SANCHEZ M, et al. Low-level, high-frequency mechanical signals enhance musculoskeletal development of young women with low BMD [J]. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 2006, 21(9): 1464-74.
- [67] WYSOCKI A, BUTLER M, SHAMLIYAN T, et al. Whole-body vibration therapy for osteoporosis: state of the science [J]. *Annals of internal medicine*, 2011, 155(10): 680-6, W206-13.
- [68] LAI C L, TSENG S Y, CHEN C N, et al. Effect of 6 months of whole body vibration on lumbar spine bone density in postmenopausal women: a randomized controlled trial [J]. *Clinical interventions in aging*, 2013, 8:1603-9.
- [69] RUBIN C, RECKER R, CULLEN D, et al. Prevention of postmenopausal bone loss by a low-magnitude, high-frequency mechanical stimuli: a clinical trial assessing compliance, efficacy, and safety [J]. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 2004, 19(3): 343-51.
- [70] LAM T P, NG B K, CHEUNG L W, et al. Effect of whole body vibration (WBV) therapy on bone density and bone quality in osteopenic girls with adolescent idiopathic scoliosis: a randomized, controlled trial [J]. *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 2013, 24(5): 1623-36.
- [71] MESTER J, KLEINODER H, YUE Z. Vibration training: benefits and risks [J]. *Journal of biomechanics*, 2006, 39(6): 1056-65.
- [72] CARDINALE M, POPE M H. The effects of whole body vibration on humans: dangerous or advantageous? [J]. *Acta physiologica Hungarica*, 2003, 90(3): 195-206.

(收稿日期: 2015-07-11)