

· 论 著 ·

宁夏回、汉老年女性原发性骨质疏松症的维生素 D 受体基因多态性研究

马宗军^{1*} 王浩² 于辛酉¹ 马荣¹ 丁小力¹ 陈振¹ 刘云宏¹ 戈朝晖¹

1. 宁夏医科大学总医院骨科, 宁夏 银川 750004

2. 宁夏医科大学, 宁夏 银川 750004

中图分类号: R58 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 12-1778-04

摘要: 目的 探讨宁夏地区回、汉老年女性原发性骨质疏松症(primary osteoporosis, PO)维生素 D 受体基因(vitamin D receptor, VDR)基因多态性分布。方法 应用聚合酶链反应限制性片段长度多态性技术(polymerase chain reaction-restrictive fragment length polymorphism, PCR-RFLP),从 2015 年至 2018 年筛选宁夏医科大学总医院门诊及住院患者,收集 119 例汉族和 111 例回族原发性骨质疏松症妇女的血液样本并进行 VDR 基因型的分型检测,探讨宁夏回、汉 VDR 基因多态性是否存在差异。结果 111 例患者的 VDR 受体基因型频率分布均符合 Hardy-Weinberg 定律,汉族和回族的女性骨质疏松症的 bb 型占 89.20%, 68.21%。Bb 基因型频率分别为 8.79% 和 27.16%, BB 基因型频率为 0.00% 和 3.80%。宁夏回、汉女性原发性骨质疏松症中 VDR 基因型频率分布差异具有统计学意义($P < 0.001$)。结论 宁夏回、汉女性原发性骨质疏松症患者 VDR 基因多态性存在民族差异性,这种民族差异性与骨质疏松症的相关性有待于进一步研究。

关键词: 维生素 D 受体基因多态性; 汉族; 回族; 骨质疏松症

Study on gene polymorphism of vitamin D receptor in elder female Han and Hui patients with primary osteoporosis in Ningxia

MA Zongjun^{1*}, WANG Hao², YU Xinyou¹, MA Rong¹, DING Xiaoli¹, CHEN Zhen¹, LIU Yunhong¹, GE Chaohui¹

1. Department of Orthopedics, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

2. Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

* Corresponding author: MA Zongjun, Email: mazongjun1983@163.com

Abstract: **Objective** To investigate the distribution of gene polymorphism of vitamin D receptor (VDR) of Han and Hui nationality population in Ningxia. **Methods** Two hundred and thirty specimens of female outpatients were collected from the clinic of General Hospital of Ningxia Medical University from 2015 to 2018. All specimens were divided into Han nationality osteoporosis group (A group, $n = 119$) and Hui nationality osteoporosis group (B group, $n = 111$), according to the diagnostic criteria of osteoporosis. The genotype of VDR was measured using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RELP). **Results** The distribution of nucleotide polymorphism in VDR was paralleled with the Hardy-Weinberg rule. Genotype bb in Han and Hui nationality was 89.20% and 68.21%, respectively. Bb genotype was 8.79% and 27.16%, respectively. BB genotype was 0.00% and 3.80%, respectively. Statistical analysis showed there was a significant difference of VDR gene polymorphism between Han nationality and Hui nationality ($P < 0.001$). **Conclusion** There is a significant difference of VDR gene polymorphism between Han and Hui nationality. The present study may contribute to a basis for the further research in the effect of diverse ethnics on osteoporosis.

Key words: vitamin D receptor gene polymorphism; Han nationality; Hui nationality; osteoporosis

随着人口老龄化速度加快,原发性骨质疏松症

(primary osteoporosis, PO)已成为严重威胁中老年人生活质量的慢性疾病^[1-2]。骨质疏松的发生、发展与多种因素密切相关。研究表明,遗传因素以及后天不同的生活方式及生活环境如饮食习惯、身体锻炼、年龄的老龄化、民族与性别等均会对 PO 产生一

基金项目:宁夏回族自治区自然科学基金(NZ15184)

* 通信作者:马宗军,Email:mazongjun1983@163.com

定的影响^[3-5]。

Morrison 等^[6]于 1994 年首次揭示维生素 D 受体 (vitamin D receptor, VDR) 基因多态性与骨密度有关以来, VDR 被证实与 OP 疾病的发生、发展密切相关。VDR 基因位于第 12 号染色体 (12q13-14)。研究表明, 炎症、感染、自身免疫疾病、慢性代谢性疾病如糖尿病, 甚至肿瘤等多种疾病均显示出与 VDR 基因多态性的相关性^[7-9]。大量研究显示^[10-11], 原发性骨质疏松与 VDR 基因 Bsm I 多态性有关, 但不同民族 PO 疾病中 VDR 基因多态性的差异性研究相对较少, 且结论不一。目前, 我国汉族与蒙古族之间 VDR 基因型多态性具有种族差异。而宁夏回族自治区地处我国西北地区, 回族人口较多, 其生活习惯、饮食结构及体育文化活动与其他民族、地区存在一定的差异。

本研究旨在采用 PCR-RFLP 对宁夏地区回、汉女性原发性骨质疏松患者 VDR 基因型频率分布进行检测, 探讨宁夏地区回、汉女性原发性骨质疏松症 VDR 分布差异, 为进一步开展原发性骨质疏松症中不同种族 VDR 基因多态性相关研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 一般资料

根据我国骨质疏松症专家共识的诊断标准^[12], 从宁夏医科大学总医院收集近 3 年 (2016 年至 2018 年) 骨科门诊及住院患者中符合纳入与排除标准的女性原发性 PO 患者 230 例, 分为汉族 PO 组 (A 组, $n=119$) 和回族 PO 组 (B 组, $n=111$)。其中, A 组平均年龄 (65.0 ± 2.7) 岁, 平均身高 (159.5 ± 3.2) cm, 平均体重 (57.9 ± 5.4) kg。B 组平均年龄 (66.4 ± 3.5) 岁, 平均身高 (161.6 ± 3.9) cm, 平均体重 (60.6 ± 5.2) kg。本研究通过了宁夏医科大学总医院伦理委员会批准并与患者签署相关知情同意书, 严格按照相关规定开展实验研究。

1.2 纳入与排除标准

纳入标准: 按原发性骨质疏松症诊治指南 (2001)^[13] ①年龄 ≥ 55 岁的老年 PO 女性患者; ②门诊及住院除外与骨代谢相关性疾病的原发性 PO 患者; ③所有患者均签署知情同意书。排除标准: ①所有继发 PO 患者; ②既往存在骨代谢相关疾病; ③既往服用抗骨质疏松症药物者。

1.3 实验材料

细胞 DNA 提取试剂盒采用的是德国 Qiagen 公司的 DNeasy Blood & Tissue Kit。PCR 扩增 VDR 所

需的特异性上、下游引物是由上海英骏生物技术有限公司合成。PCR 扩增采用的是美国 Thermo 公司 Thermo Scientific™ Phusion™ kit。针对 5' 'GAATGC3' 位点的限制性内切酶 Bsm I 是美国 NEB 生命科技有限公司的产品。其他试剂如磷酸盐缓冲液、乙醇、异丙醇、电泳试剂等均为国产分析纯。采用美国 Bio-rad 公司 PCR 仪开展 PCR 扩增。采用北京六一仪器厂的电泳设备进行电泳检测分析。

1.4 方法

1.4.1 提取 DNA: 按照 DNA 提取试剂盒说明书提取血液 DNA。

1.4.2 扩增 VDR 基因: PCR 扩增采用的上、下游引物分别为: 5'-GAACCAAGACTACAAGTACCGCGT CAGTGA-3' (30 bp); 5'-TGGCCGGCAGCGGATGTA CGTCTGC-3' (24 bp)^[10]。50 μ L 反应体系: $2 \times$ Mix 25 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 模板 DNA 1 μ L, 加入 ddH₂O 至总体积 50 μ L。95 $^{\circ}$ C 5 min; 随后 95 $^{\circ}$ C 30 s、60 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 45 s, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离后切胶纯化。

1.4.3 限制性酶切扩增产物: 采用 Bsm I 酶切扩增产物, 反应体系为: 2 μ L 10 $\times$ buffer, 0.5 μ L (2U) Bsm I 内切酶, 10 μ L PCR 产物, 无菌去离子水补足总体积至 20 μ L; 37 $^{\circ}$ C 过夜。酶切产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后紫外检测酶切结果。

1.5 统计学处理

使用 SPSS 18.0 统计软件对实验数据进行统计学分析。基因型频率与遗传平衡定律的符合 Hardy-Weinberg 定律, 计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表明差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 VDR 基因扩增及酶切鉴定结果

经 PCR 扩增后琼脂糖凝胶电泳结果表明, 扩增产物为 1 850 bp, 与 VDR 基因 DNA 片段长度一致。纯化产物经 Bsm I 酶切, 缺乏相应酶切位点为 BB 型 (1 850 bp), Bb 型 (1 850、1 200、650 bp) 为杂合子, bb 型 (1 200、650 bp) 则代表存在相应酶切位点的等位基因。本研究所有基因型频率分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡, PO 患者 VDR 基因以 bb 型居多, 见图 1。

2.2 VDR 基因型和等位基因频率多态性分布

如表 1 所示, 对两组患者的基因型频率进行分

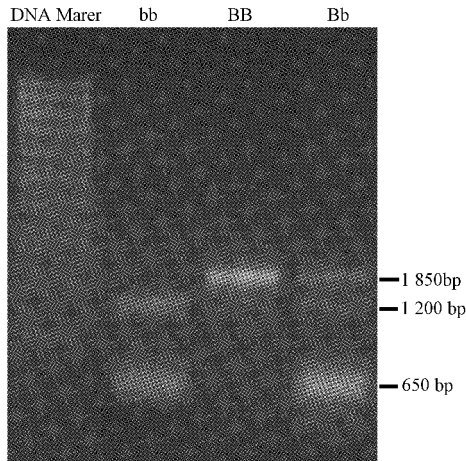


图 1 基因分型 1.2% 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.1 Electrophoresis results of gene phenotype

析发现,宁夏汉族 bb、Bb 基因型频率分布分别为 89.20% 和 8.79%, 未见 BB 型。宁夏回族 bb、Bb、BB 基因型频率分布分别为 68.21%、27.16% 和 3.18%。宁夏回、汉女性原发性骨质疏松症中的 VDR 基因型频率分布比较,差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)。

表 1 回、汉患者的 VDR 基因型与等位基因频率比较一览表 (%)

Table 1 Comparison of VDR genotype and allele frequency between Han and Hui nationality (%)

组别	基因型*			等位基因 [#]	
	bb	Bb	BB	b	B
A 组	89.20	8.79	0.00	5.21	94.79
B 组	68.21	27.16	3.80	15.84	84.16

注: $\chi^2 = 85.798$, * $P < 0.001$; $\chi^2 = 81.416$, [#] $P < 0.001$ 。

3 讨论

骨质疏松症是临床上较为常见的一种慢性疾病,受包括环境、基因遗传、营养、种族等多种原因导致的骨密度和骨质量下降。而 VDR 基因是较早被确认的与骨质疏松相关的基因,其多态性与原发性骨质疏松的发生密切相关^[6]。本研究证实了宁夏回、汉女性原发性骨质疏松症患者中 VDR 基因频率具有显著的差异,提示不同种族女性 PO 和 VDR 多态性存在差异性。

VDR 基因表达的维生素 D 受体 (VDR) 是一种 DNA 结合的转录因子,主要表达于外周血单核细胞和活化的 T 细胞^[14]。VDR 属于核受体超家族,与多种疾病的发生发展密切相关。VDR 基因最常见的多态性位点包括 Bsm I、Fok I、Taq I 和 Apa I。

而本研中选取的 Bsm I 位于 VDR 基因 3' 端第 8 个内含子,其本身不表达为蛋白质,但是会通过改变 VDR 基因 mRNA 的稳定性、mRNA 转录的剪接位点、或内含子调节元件,影响基因的表达及功能,是关键 VDR 基因多态性位点之一^[15]。

维生素 D 是重要的骨代谢调节激素之一,不同地区或种族之间 VDR 基因多态性的分布频率具有显著差异^[11]。美国、澳大利亚、法国以 Bb 基因型最多,其次为 bb 型,BB 型占 17%~22%^[16]。本研究在回族人群中 BB 基因型占 3.8%,而汉族中未检测到该基因型,提示宁夏回、汉女性原发性骨质疏松症中 VDR 基因频率具有显著的差异,说明与不同种族具有显著相关性。而本研究发现宁夏回、汉女性均主要以 bb 基因型为主 (89.2% 和 68.21%), 汉族未检测出 BB 型。而哈萨克族与欧美人种相差不显著。这之前报道的中国维族、蒙族以及哈萨克族 VDR 基因多态性的分布频率相近,同时与韩国及日本的研究结果相近^[11,17]。Morrison 等^[6]研究发现,60 岁以上健康妇女,75% 的 BB 基因型的骨密度低于骨折域,可能成为骨质疏松患者,提示该基因型与骨质疏松密切相关。

不同民族的 VDR 基因多态性分布还可能与人群的遗传背景、生活习惯及地理环境等因素相关。遗传因素在影响骨密度的因素总占主要地位,根据 VDR 基因多态性的研究回顾,发现不同民族间在 BB 基因型分布频率上具有差异,提示在今后的临床实践中或可根据民族将 VDR 基因型多态性做为骨质疏松风险评估指标,同时对比和分析同一地区不同性别骨质疏松患者 VDR 基因型频率分布进行检测,对 VDR 基因多态性分布存在指导意义。我们研究宁夏回、汉民族原发性骨质疏松症女性 VDR 基因多态性分布,将为评估宁夏回、汉人群的 PO 相关并发症如骨质疏松性压缩骨折的风险提供了参考。

【参考文献】

- [1] 邱贵兴. 老年骨质疏松性骨折的治疗策略[J]. 中华老年骨科与康复电子杂志, 2015, 1(1): 1-5.
- [2] 刘连勇, 郑胜喜, 甄燕, 等. 原发性骨质疏松症的骨骼免疫机制研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(7): 912-917.
- [3] Ongphiphadhanakul B. Osteoporosis: the role of environment [J]. Forum Nutr, 2007, 60: 158-167.
- [4] Yeam CT, Chia S, Tan H, et al. A systematic review of factors affecting medication adherence among patients with osteoporosis [J]. Osteoporos Int, 2018, 29(12): 2623-2637.
- [5] 马宗军, 闫军法, 张汉霖, 等. 宁夏汉族与回族老年女性原发

- 性骨质疏松症降钙素受体基因多态性研究[J].宁夏医学杂志, 2018, 40(7): 580-582.
- [6] Morrison NA, Qi JC, Tokita A, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles[J]. *Nature*, 1994, 367(6460): 284-287.
- [7] Aimei LI, Wei Z, Hao Z, et al. Vitamin D/vitamin D receptor, autophagy and inflammation relevant diseases[J]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2017, 42(8): 979-985.
- [8] Bizzaro G, Antico A, Fortunato A, et al. Vitamin D and autoimmune diseases: is vitamin D receptor (VDR) polymorphism the culprit[J]? *Isr Med Assoc J*. 2017, 19(7): 438-443.
- [9] Rai V, Abdo J, Agrawal S, et al. Vitamin D receptor polymorphism and cancer: an update[J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(8): 3991-4003.
- [10] 孟德峰, 杨立, 张斌, 等. 维生素 D 受体和降钙素受体基因多态性与新疆地区汉族女性人群骨密度的相关性[J]. *广东医学*, 2017, 38(9): 1343-1347.
- [11] 张红红, 陶国枢, 高宇红, 等. 我国四种民族维生素 D 受体基因多态性分布的研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2006, 12(1): 1-3.
- [12] 中国老年学学会骨质疏松委员会. 中国人骨质疏松症诊断标准专家共识(第三稿·2014 版)[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2014, 20(9): 1007-1010.
- [13] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症诊治指南(2011 年)[J]. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2011, 3(4): 2-17.
- [14] Bhalla AK, Amento EP, Clemens TL, et al. Specific high-affinity receptors for 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ in human peripheral blood mononuclear cells: presence in monocytes and induction in T lymphocytes following activation [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1983, 57: 1308-1310.
- [15] Carlberg C, Campbell MJ. Vitamin D receptor signaling mechanisms: integrated actions of a well-defined transcription factor [J]. *Steroids*, 2013, 78: 127-136.
- [16] Hustmyer FG, Deluca HF, Peacock M, Apa I, Bsm I, EcoR V and Taq I polymorphism at the human vitamin D receptor gene locus in Caucasians, Blacks and Asians [J]. *Human Molecular Genetics*, 1993, 2: 487.
- [17] 王红清, 徐佩茹, 李敏, 等. 新疆汉族和哈萨克族儿童维生素 D 受体基因多态性与超重或肥胖的关系研究[J]. *中国全科医学*, 2015, 18(18): 2141-2147.

(收稿日期: 2018-11-22; 修回日期: 2019-04-22)

(上接第 1768 页)

- [10] Cui RT, Zhou L, Li ZH, et al. Assessment risk of osteoporosis in Chinese people: relationship among body mass index, serum lipid profiles, blood glucose, and bone mineral density [J]. *Clin Interv Aging*, 2016, 4(11): 887-895.
- [11] Finkelstein JS, Brockwell SE, Mehta V, et al. Bone mineral density changes during the menopause transition in a multiethnic cohort of women [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93(3): 861-868.
- [12] Tachiki T, Kouda K, Dongmei N, et al. Muscle strength is associated with bone health independently of muscle mass in postmenopausal women: the Japanese population-based osteoporosis study [J]. *J Bone Miner Metab*, 2019, 37(1): 53-59.
- [13] Dankbar B, Fennen M, Brunert D, et al. Myostatin is a direct regulator of osteoclast differentiation and its inhibition reduces inflammatory joint destruction in mice [J]. *Nat Med*, 2015, 21(9): 1085-1090.
- [14] Liu PY, Ilich JZ, Brummel SK, et al. New insight into fat, muscle and bone relationship in women: determining the threshold at which body fat assumes negative relationship with bone mineral density [J]. *Int J Prev Med*, 2014, 5(11): 1452-1463.
- [15] Leslie WD, Orwoll ES, Nielson CM, et al. Estimated lean mass and fat mass differentially affect femoral bone density and strength index but are not FRAX independent risk factors for fracture [J]. *J Bone Miner Res*, 2014, 29(11): 2511-2519.

(收稿日期: 2018-10-15; 修回日期: 2019-01-25)