

基础研究 ·

维生素 D 受体基因型与骨密度

陈训华 杨淑芹 梁雅香 张万强

(中国中医研究院骨伤科研究所,北京 100700)

【摘要】目的 考察维生素 D 受体(VDR)基因多态性在我国汉族人群中的分布频率,分析 VDR 基因型与骨密度的关系。方法 采用聚合酶链反应和限制性酶切技术检测 100 例绝经前健康妇女 VDR 基因多态性。应用双能 X 线骨密度仪检测受试者腰椎及髋部骨密度。结果 VDR 基因型分布频率为 BB 型 4.0%,Bb 型 10.0%,bb 型 86.0%;而三种基因型受试者髋部及腰椎骨密度均表现出 Bb > bb > BB,经 F 检验腰椎骨密度 3 基因型比较, $P < 0.05$,具有显著差异。结论 绝经前妇女 VDR 基因型分布频率与西方及国内的一些报道不尽相同,且骨密度显示出 Bb > bb > BB,亦与国内外一些研究结果不同。

【关键词】骨密度 基因型 骨质疏松 腰椎 髋

The relationship between vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density CHEN Xunhua, YANG Shuqin, LIANG Yaxiang, et al. The Orthopaedics and Traumatic Institute, Chinese Academy of TCM (Beijing, 100700)

【Abstract】 Objective To study the frequency distribution of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms in Chinese and to evaluate the relationship between VDR gene polymorphisms and bone mineral density (BMD) **Methods** VDR gene polymorphisms of 100 healthy pre-menopausal women was detected by using polymerase chain reaction (PCR) and restrictive analysis methods. The BMD values in lumbar vertebrae and hip of the women were measured by using dual energy X-ray absorptiometry (DEXA). **Results** The frequency distribution of VDR genotype was bb 86.0%, Bb 10.0% and BB 4.0%. The BMD values in hip and lumbar vertebrae of the women with 3 type of gene were Bb > bb > BB ($P < 0.05$). **Conclusion** In this study, the frequency distribution of VDR genotype in pre-menopausal women is sharply different from that of reports in western countries, as well as in Chinese. The BMD of Bb > bb > BB is also apart from other study results.

【Key Words】 Bone density Genotype Osteoporosis Lumbar vertebrae Hip

骨质疏松症是一种多因素疾病,主要特征是单位体积骨量减少,骨脆性增加。影响骨量的因素可分为环境因素和遗传因素两种:如营养、运动及生活习惯为可控的环境因素。而近年来遗传因素对骨量的影响随着分子生物学技术的发展,逐步引起人们的重视。一些学者认为,人群骨量差异 75%~80% 受遗传因素控制。近年来,国内外学者对维生素 D 受体(VDR)基因与骨量及骨代谢的关系进行了研究,有些研究发现,VDR 基因型与骨密度(BMD)关联,即高 BMD 与 VDR 基因 bb 型有关,而低 BMD 则与 BB 型有关^[1]。而有些实验则未发现 VDR 基因与骨量有关^[2]。

本研究采用聚合酶链反应(PCR)和限制性酶切技术,检测了 100 例绝经前汉族妇女维生素 D 受体等位基因型,观察基因型与腰椎及左侧髋部 BMD 的关系。

1 材料与方法

1.1 试剂 全血 DNA 提取试剂盒,基因公司(QIAGEN Inc.)产品, Taq DNA 聚合酶, dNTP PCR 缓冲液均为 Boehr-

inger Mannheim 的产品;限制性内切酶 Bsm I 由 New England Biolabs 提供, DNA 标准片段由 Life Technologies Inc 提供。

1.2 引物序列的设计与合成 引物序列设计同 Morrison^[1] P1 5'-CAACCAA GACTACAA GTACC GCGTCA GTGA-3' 和 P2 5'-AACCA GCGGGAA GAGGTCAA GGG-3' 由北京赛百盛(美国)生物工程公司合成。

1.3 观察对象 北京地区 100 例汉族健康绝经前妇女,年龄为 45~50 岁,平均 47.26 ± 2.24 岁,月经正常,排除内脏疾病及其它影响骨代谢的疾患。静脉取血,ACD(Acid Citrate Trisodium Citrate)抗凝。

1.4 维生素 D 受体等位基因型检测 提取 DNA:采用基因公司全血 DNA 提取试剂盒,操作步骤按试剂盒说明书进行。PCR 扩增:反应体系为 100μl,将反应管置热循环仪(PE480 型)中,94 预变性 3min,80 变性 5min,67 延伸 1min,72 延伸 2min,随后 94 变性 10min,67 退火 1min,72 延伸 3min,程序循环 29 次,最后 72 延伸 10min。扩增产物限制性酶切位点检测:取 PCR 扩增产物 5μl,加 Bsm I 1ml 后,置 65

水浴保温 3 小时,取反应物 10μl,经 2%琼脂糖电泳,EB 染色,紫外光下判断结果,根据电泳条带的数目和位置,判定基因类型,无酶切点的纯合子 BB 基因型仅有 1 条带(825bp),有酶切位点 bb 基因型有 2 条带(650bp,175bp),杂合子 Bb 基因型有 3 条带(825bp,650bp,175bp)见图 1。



图 1 VDR 等位基因型电泳图谱

1.5 骨密度检测 采用双能量 X 射线骨密度仪 (DEXA, 美国 Lunnar 公司) 检测受试者 L₂₋₄ 腰椎正位及左侧髌部骨密度值 (BMD), 结果以 $\bar{X} \pm Sg/cm^2$ 表示。

1.6 统计学处理 F 检验

2 结果

(1) 100 例绝经前妇女维生素 D 受体基因型分布频率分别为 bb86.0%, Bb10.0%, BB4.0%。

(2) 骨密度见表 1、2。髌部即股骨颈、大转子及 Ward's

表 1 VDR 基因型与髌部 BMD ($\bar{X} \pm S$) g/cm²

检测部位	bb (n=86)	Bb (n=10)	BB (n=4)
股骨颈	0.8966 ± 0.1173	0.9633 ± 0.1181	0.8263 ± 0.0676
大转子	0.8196 ± 0.1368	0.8946 ± 0.1200	0.7533 ± 0.0889
Ward's 区	0.7814 ± 0.1077	0.8563 ± 0.1100	0.7183 ± 0.0847

注:bb,Bb,BB 相比较, P>0.05

表 2 VDR 基因型与腰椎 BMD ($\bar{X} \pm S$) g/cm²

检测部位	bb (n=86)	Bb (n=10)	BB (n=4)
L ₂	1.1373 ± 0.1296 *	1.2316 ± 0.1215	1.0493 ± 0.1132
L ₃	1.2031 ± 0.1359 *	1.3260 ± 0.1358	1.1518 ± 0.1210
L ₄	1.2043 ± 0.1461 *	1.3273 ± 0.1810	1.1575 ± 0.1019
L ₂₋₄	1.1827 ± 0.1316 *	1.2963 ± 0.1410	1.1235 ± 0.1054

注:bb,Bb,BB 相比较, * P<0.05

区,Bb,bb 及 BB 型的 BMD 没有显著性差异, P>0.05,但腰椎 L₂、L₃、L₄ 及 L₂₋₄ 的结果显示 Bb 型 BMD 高于 bb 型及 BB 型, P<0.05。

3 讨论

Morrison 等^[1]经实验证明 VDR 基因多态性与 BMD 密切相关,可占其遗传因素的 75%左右,通过对 100 例北京地区健康汉族绝经前妇女的测定,VDR 基因型的分布分别为 bb 86.0%、Bb10.0%、BB4.0%。本实验结果与韩国、日本等测定结果相近,以 bb 型最多,约占总基因型的 80%~90%,其余为 Bb 和 BB, BB 基因型在本实验中占 4.0%,这个结果与国内以前发表的研究结果有所不同^[3],即只有 2 种基因型而未发现 BB 型;也不同于西方如澳、法、美等国家以 Bb 型为最多,其次为 bb 型。

有些研究结果与 Morrison 的实验结果一致,这些研究认为 VDR 基因与 BMD 关系密切,即 BB 型 BMD 低于 Bb 及 bb 型,而 Bb 型的 BMD 又低于 bb 型,具有明显差异,提示 VDR 基因型预测 BMD 的可能性。然而我们研究基因多态性的分析结果显示出 Bb 型 BMD 高于 bb 型及 BB 型 BMD,腰椎正位 BMD、L₂、L₃、L₄ 及 L₂₋₄ 的测定结果经 F 检验具有显著性差异 P<0.05,髌部即股骨颈、大转子及 Ward's 三角区亦显示出 Bb 型 BMD 高于 bb 型及 BB 型,但 F 检验 P>0.05,不具有显著性差异。

近年国内外有关 VDR 基因预测 BMD 的研究不少,但其结果各异。我们的实验人群数有限,使观察 VDR 基因型与 BMD 的关系受到一定限制。考虑因种族差异,使得 VDR 基因型分布不同;生存环境使得 VDR 基因的表达不同或者由于实验室条件及操作方法等的不一致性,使得研究结果不同。许多相异、甚至相反的结果提示:骨量不是由单独的基因而是由多数的基因组调节的可能性。因此我们认为,以 VDR 等位基因型来预测 BMD 水平,需要长期、大量的工作来证实其可靠程度。

参考文献

[1] Morrison NA, QI JC, Tokita A, et al. Predion of bone density form Vitamin D receptor alleles. Nature, 1994, 367: 284-287.
 [2] Garenro P, Borel O, Sornay-kendu E, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms do not Predic bone turnover and bone mass in healthy Premenopausal women. J Bone Mineral Res, 1995, 10: 1283-1288.
 [3] 阎立娅, 王晓江, 张卉, 等. VDR 基因型分布及其与骨矿含量的关系. 中国骨质疏松杂志, 1997, 2(3): 19-21.

(收稿:2000-09-30 编辑:李为农)

· 书讯 ·

《创伤骨科诊治失误对策》出版

由胡广医师编著,王亦聰教授、李也白教授作序的《创伤骨科诊治失误对策》一书,已于 2001 年 4 月由人民卫生出版社出版发行。本书作者根据国内外大量科技文献和学术资料,结合骨科最新进展和作者的临床实践,深入系统地研究分析创伤骨科诊治中的失误,提出各种行之有效的防范措施与原则,为骨科临床医生,尤其是青年医生少走弯路、减少失误展示崭新的思路。

全书约 60 余万字,400 余幅插图,16 开精装本,定价 50 元。需要者请汇款至浙江省乐清市人民医院骨科胡凯医师、吴纪奎医师。邮政编码:325600;电话:(0577) 62522911—305 或 13806606706。