

护骨素基因A163G多态性与北京地区老年人群骨密度的关系**

魏雅楠, 刘杰, 陈陵霞, 郑蓉, 苗懿德

Association between A163G polymorphism of the osteoprotegerin gene and bone mineral density in the Chinese elderly from Beijing Area

Wei Ya-nan, Liu Jie, Chen Ling-xia, Jia Rong, Miao Yi-de

Abstract

BACKGROUND: Osteoprotegerin gene is the candidate gene of osteoporosis, and the ethnic divergence of gene polymorphisms exists.

OBJECTIVE: To investigate the association between A163G polymorphism of the osteoprotegerin gene and bone mineral density in the elderly in Beijing.

METHODS: A total of 307 elderly were included in this study. The bone mineral density in proximal femur, lumbar vertebra and forearm was determined by dual energy X-ray absorptiometry and DNA was extracted from peripheral blood. The A163G polymorphism of the osteoprotegerin gene was assessed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis and gene sequencing was performed. Differences in bone mineral density among different genotypes were compared using one-way analysis of variance. Bone mineral density-related factors were analyzed using multiple stepwise linear regression analysis.

RESULTS AND CONCLUSION: In elderly women, the AA genotype of the A163G was associated with significantly lower bone mineral density at lumbar and femoral inter area; while in elderly men, no association was found between the A163G polymorphisms and bone mineral density. These findings suggest that A163G genotypes in the osteoprotegerin gene promoter are associated with bone mineral density in elderly women.

Wei YN, Liu J, Chen LX, Jia R, Miao YD. Association between A163G polymorphism of the osteoprotegerin gene and bone mineral density in the Chinese elderly from Beijing Area. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(46): 8737-8740. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

Department of Geratology, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China

Wei Ya-nan★, Master, Attending physician, Department of Geratology, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China y.n.wei@hotmail.com

Supported by: Research and Development Foundation of Peking University People's University, No. RDI2008-02*

Received: 2011-06-11
Accepted: 2011-06-21

摘要

背景: 护骨素基因是骨质疏松症的候选基因, 其基因多态性存在种族差异。

目的: 探讨北京地区老年人群中护骨素基因启动子区域 A163G 位点多态性与骨密度的关系。

方法: 选取 307 名老年受试者, 采用双能 X 射线骨密度吸收仪测定股骨近端、腰椎及前臂骨密度, 取其外周血提取 DNA, 采用多聚酶链反应-限制性片段长度多态性方法测定护骨素基因 A163G 多态性, 并进行基因测序。采用单因素方差分析比较不同基因型对应的骨密度变化, 逐步回归法分析骨密度的相关因素。

结果与结论: 在绝经后老年女性受试者中, 腰椎、股骨 Inter 区, AA 型骨密度高于 AG 或 GG 型, 老年男性受试者中, 各基因型所对应的骨密度, 没有明显差异。提示护骨素基因启动区域 A613G 多态性与绝经后老年女性骨密度有一定关联。

关键词: 护骨素; 基因; 多态性; 骨密度; 骨质疏松症; 北京地区

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.46.045

魏雅楠, 刘杰, 陈陵霞, 郑蓉, 苗懿德. 护骨素基因 A163G 多态性与北京地区老年人群骨密度的关系[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(46):8737-8740. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

0 引言

骨质疏松症为多基因复杂遗传病, 该病是在各种高危环境因素及代谢因素基础上, 多种易感基因累加效应所致。临床上常用骨密度标示骨量。群体中 75%~85% 的骨密度变异为遗传因素所致^[1-3]。其中, 护骨素是参与破骨细胞功能及骨代谢关键的调节因子, 其主要功能为抑制破骨细胞形成、分化、存活并诱导破骨细胞凋亡^[4-7]。定点消融护骨素基因的小鼠表现出严重的骨质疏松症, 而过度表达护骨素的转基因小鼠则出现严重的骨质硬化症^[8]。研究显示, 护骨素是骨质疏松症的重要候选基因, 其基因多

态性可能是骨量代谢的重要遗传因素, 同时, 多项研究显示护骨素基因多态性与骨质疏松症的相关性存在种族差异^[9-13]。护骨素基因启动子区域涵盖多个参与护骨素基因表达的结合位点, 近年来, 关于护骨素基因启动子区域基因多态性与骨量的关系研究日益深入^[13-14], 鉴于基因多态性存在种族及地域差异, 本文拟探讨在北京地区老年人群中护骨素基因启动子区域 A163G 位点多态性与骨密度的关系。

1 对象和方法

设计: 基因多态性回顾性研究。

时间及地点: 于 2008-09/2010-04 在北京

北京大学人民医院老年医学科, 北京市 100044

魏雅楠★, 女, 1980 年生, 汉族, 硕士, 主治医师, 主要从事骨质疏松症方面的研究。y.n.wei@hotmail.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)46-08737-04

收稿日期: 2011-06-11
修回日期: 2011-06-21
(20110427020/YJ·S)

大学人民医院完成。

对象: 随机选择2008-09/2010-04于北京大学人民医院老年科门诊随诊或例行查体老年人为研究对象进行病史询问及临床检查。纳入标准: ①年龄 ≥ 65 岁。②如为女性, 已绝经。③对实验知情同意。排除标准: ①严重甲状腺疾病、甲状旁腺疾病等器质性内分泌疾病。②肾脏疾病。③神经系统疾病。④骨代谢疾病。⑤服用骨代谢药物史。⑥外伤骨折史。最终共入选307例老年受试者, 其中男性208例, 女性99例。

方法:

骨密度测定: 采用Delphi A 70907型双能X射线骨密度吸收仪(美国Hologic公司)测定双侧股骨近端股骨颈、大转子、Inter区、Ward's三角区及腰椎L₁₋₄后前位、前臂骨密度。骨密度的测定通过扫描区总的骨质量(g)除以扫描区的骨面积(cm²)得到。

基因型测定: 采外周血3 mL, EDTA抗凝, 采用美国Invitrogen公司全血DNA提取盒提取基因组DNA。采用多聚酶链反应-限制性片段长度多态性方法测定护骨素基因 A163G 多态性。首先对样本进行PCR扩增(Henma4.0 PCR仪, 珠海黑马医疗仪器有限公司), 设计护骨素基因163位点PCR引物: 上游引物: 5'-CCA TCA TCA AAG GGC TAT TGG-3'和下游引物: 5'-CTG GAG ACA TAT AAC TTG AAC-3'。PCR反应体系: 25 μ L, 其中模板DNA 1 μ L, 上下游引物各1 μ L, 2 $\times$ Taq Master Mix 12.5 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。PCR反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性5 min, 然后94 $^{\circ}$ C 30 s, 62 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 循环30个周期后, 72 $^{\circ}$ C 再延伸10 min。A163G 位点PCR产物长度为300 bp(2 $\times$ Taq Master Mix, 北京Tian Gen Biotech.公司)。酶切反应: PCR产物经限制性内切酶Ase I(美国New England Biolabs公司)37 $^{\circ}$ C 反应1 h, 酶切产物于含EB的1%琼脂糖凝胶电泳确定基因型。存在Ase I 酶切位点的纯合子AA型, 显示161 bp和139 bp两个条带, 缺乏Ase I 酶切为纯合子GG型, 显示300 bp条带, 杂合子AG型则显示了上述3条带。选择进行基因测序, 以保证基因型鉴定的准确性。

主要观察指标: 研究对象的骨密度及OPG基因启动子区A163G单核苷酸基因多态性。

统计学分析: 采用SPSS15.0统计软件完成统计学分析, χ^2 检验检测多态基因是否符合Hardy-Weinberg平衡, 3组间均数比较采用单因素方差分析。多因素分析采用逐步回归法分析骨密度的相关因素。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

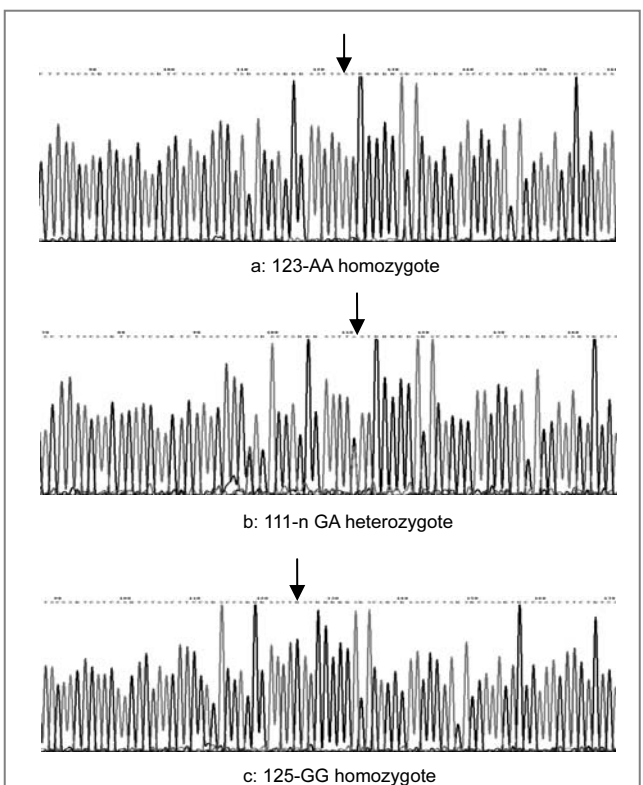
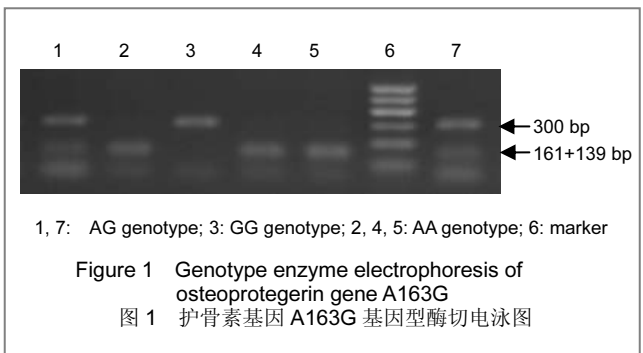
2 结果

2.1 实验对象数量分析 307例老年受试者全部纳入结果分析, 参与者基线资料见表1。

表1 研究对象基本情况
Table 1 Baseline data of subjects

Item	Male	Female
<i>n</i>	208	99
Age ($\bar{x} \pm s$, yr)	75.8 $\pm$ 10.1	77.1 $\pm$ 7.7
Body mass ($\bar{x} \pm s$, kg)	70.3 $\pm$ 11.3	60.6 $\pm$ 8.8
Body mass index ($\bar{x} \pm s$, kg/m ²)	24.4 $\pm$ 3.3	24.8 $\pm$ 3.5

2.2 护骨素基因A163G基因型分布 图1为护骨素基因A163G基因型酶切电泳图。存在Ase I 酶切位点的纯合子AA型, 显示161 bp和139 bp两条带, 缺乏Ase I 酶切为纯合子GG型, 显示300 bp条带, 杂合子AG型则显示了上述3条带。进一步进行基因测序, 图2为护骨素基因A163G多态性的基因测序图。



AA、AG、GG三种基因型频率分别为: 女性: 58.6%, 26.3%, 15.1%, 男性: 72.1%, 25.0%, 2.9%, A和G等位基因频率分别为: 女性: 71.7%、28.3%; 男性: 84.6%、15.4%。基因型频率分布符合Hard-Weinberg平衡。

2.3 护骨素基因 A163G 基因型分布与骨密度的关系
在绝经后老年女性受试者中, AA型腰椎、股骨Inter区骨密度高于AG或GG型($P=0.001$ 和 0.004), 而AA、AG和GG型受试者的前臂、大转子、Ward's三角骨密度差异无显著性意义, 见表2。

表2 护骨素基因 A163G 各基因型绝经后老年女性的骨密度
Table 2 Bone mineral density of osteoprotegerin gene A163G genotypes in older postmenopausal women ($\bar{x}\pm s$, g/cm²)

Position	A163G genotype			P
	AA (n=58)	AG (n=26)	GG (n=15)	
Lumbar	0.86±0.13	0.82±0.17	0.69±0.15	0.001
Neck of femur	0.63±0.09	0.60±0.11	0.56±0.10	0.062
Greater trochanter	0.52±0.10	0.51±0.11	0.45±0.10	0.076
Trochanter	0.89±0.13	0.85±0.17	0.74±0.10	0.004
Ward's triangle	0.41±0.12	0.38±0.12	0.35±0.08	0.128
Femur	0.74±0.11	0.69±0.15	0.62±0.13	0.007
Forearm	0.42±0.06	0.42±0.07	0.39±0.13	0.233

在老年男性受试者中, 腰椎、股骨大转子、Ward's三角、Inter区、前臂骨密度在AA、AG、GG三种基因型中差异无显著性意义, 见表3。

表3 护骨素基因 A163G 各基因型老年男性的骨密度
Table 3 Bone mineral density of osteoprotegerin gene A163G genotypes in older men ($\bar{x}\pm s$, g/cm²)

Position	A163G genotype			P
	AA (n=150)	AG (n=52)	GG (n=6)	
Lumbar	1.03±0.17	1.03±0.20	0.96±0.24	0.631
Neck of femur	0.73±0.12	0.71±0.14	0.72±0.16	0.862
Greater trochanter	0.67±0.11	0.65±0.13	0.64±0.17	0.410
Trochanter	1.05±0.18	1.03±0.19	1.07±0.20	0.772
Ward's triangle	0.52±0.14	0.50±0.14	0.49±0.17	0.597
Femur	0.89±0.14	0.87±0.16	0.88±0.19	0.594
Forearm	0.56±0.07	0.57±0.07	0.55±0.10	0.928

进一步, 女性受试者中, 分别以各部位骨密度为因变量, 年龄、BMI及A163G基因型为自变量进行多元逐步回归分析, 结果显示BMI及A163G基因型进入方程, 见表4。

表4 多元逐步回归分析结果
Table 4 Results of multiple stepwise regression analysis

Position	Factor	Standard regression coefficient	P
Lumbar	Bone mineral density	0.013	0.000
	A163G	-0.053	0.006
Femur	Bone mineral density	0.009	0.017
	A163G	-0.037	0.042

3 讨论

护骨素基因位于染色体8q23-24, 编码5个外显子。护骨素作为护骨素具有抑制破骨细胞形成、分化、存活并诱导破骨细胞凋亡的功能, 其部分功能与核转录因子 κ B受体活化因子(receptor activator of nuclear factor- κ B, RANK)和核转录因子 κ B受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL)密切相关。护骨素为RANK/RANKL的诱饵受体, 与RANK竞争结合RANKL, 进而抑制破骨细胞的分化、活化, 并且诱导成熟破骨细胞的凋亡^[15-17]。鉴于其在骨代谢的重要作用, 护骨素已成为骨质疏松症的主要候选基因, 近年来多项研究显示, 护骨素启动子区域涵盖多个介导护骨素表达的钙调节因子结合位点, 其基因多态性可能与骨量的遗传调节有关^[14, 18-19]。

本研究发现在绝经后老年女性受试者中, 腰椎、股骨Inter区, AA基因型骨密度高于AG或GG型, 提示AA型绝经后老年女性骨量丢失速率可能低于AG型或GG型, A等位基因对骨量有一定保护作用, G等位基因是骨密度减少的危险因素。捷克一项高加索绝经后女性的研究显示A163G与足跟超声变量相关, GG型具有更高的跟骨声速($P=0.0102$)^[19], 丹麦绝经后女性的研究同样提示G等位基因与前臂低骨量、跟骨低超声衰减相关, 同时其骨折发生率更高^[14]。重庆地区一项基于绝经早期女性的研究显示类似的结果^[9]。本研究中进一步多元逐步回归分析结果显示, BMI与A163G与腰椎、股骨相关, 其中A163G分别决定了腰椎、股骨5.3%、3.7%的变异, 可见骨量是由于多种遗传和环境因素综合作用的结果。然而, 在基于澳大利亚和西班牙女性的研究中并未发现A163G多态性与骨量相关^[13, 20]。出现这种差异的可能原因与受试对象的研究数量、种族与地域有关。

本研究同时进行了老年男性受试者护骨素基因A163G多态性的研究, 三种基因型中骨密度差异无统计学意义。提示A163G多态性可能存在性别差异, 扩大样本量在更大的人群中深入研究有助于论证。

因此, 护骨素基因启动区域A163G多态性与北京地区绝经后老年女性骨密度有一定关联, 推测A等位基因可能对骨密度有一定保护作用, G等位基因则可能为骨密度减少的危险因素。

4 参考文献

- [1] Laan RF. Osteoporosis. *Neth J Med*. 2007;65(2):47-48.
- [2] Deng HW, Chen WM, Conway T, et al. Determination of bone mineral density of the hip and spine in human pedigrees by genetic and life-style factors. *Genet Epidemiol*. 2000;19(2):160-177.
- [3] Zmuda JM, Cauley JA, Ferrell RE. Recent progress in understanding the genetic susceptibility to osteoporosis. *Genet Epidemiol*. 1999;16(4):356-367.

- [4] Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998;93(2):165-176.
- [5] Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med (Berl)*. 2001;79(5-6):243-253.
- [6] Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther*. 2007;9 Suppl 1:S1.
- [7] Kong YY, Penninger JM. Molecular control of bone remodeling and osteoporosis. *Exp Gerontol*. 2000;35(8):947-956.
- [8] Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*. 1998;12(9):1260-1268.
- [9] Lee YH, Woo JH, Choi SJ, et al. Associations between osteoprotegerin polymorphisms and bone mineral density: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2010;37(1):227-234.
- [10] Moffett SP, Oakley JL, Cauley JA, et al. Osteoprotegerin Lys3Asn polymorphism and the risk of fracture in older women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(5):2002-2008.
- [11] Kim JG, Kim JH, Kim JY, et al. Association between osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK), and RANK ligand (RANKL) gene polymorphisms and circulating OPG, soluble RANKL levels, and bone mineral density in Korean postmenopausal women. *Menopause*. 2007;14(5):913-918.
- [12] Yamada Y, Ando F, Niino N, et al. Association of polymorphisms of the osteoprotegerin gene with bone mineral density in Japanese women but not men. *Mol Genet Metab*. 2003;80(3):344-349.
- [13] Ueland T, Bollerslev J, Wilson SG, et al. No associations between OPG gene polymorphisms or serum levels and measures of osteoporosis in elderly Australian women. *Bone*. 2007;40(1):175-181.
- [14] Jørgensen HL, Kusk P, Madsen B, et al. Serum osteoprotegerin (OPG) and the A163G polymorphism in the OPG promoter region are related to peripheral measures of bone mass and fracture odds ratios. *J Bone Miner Metab*. 2004;22(2):132-138.
- [15] Vega D, Maalouf NM, Sakhaee K. CLINICAL Review #: the role of receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK)/RANK ligand/osteoprotegerin: clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(12):4514-4521.
- [16] Fili S, Karalaki M, Schaller B. Therapeutic implications of osteoprotegerin. *Cancer Cell Int*. 2009;9:26.
- [17] Masi L, Simonini G, Piscitelli E, et al. Osteoprotegerin (OPG)/RANK-L system in juvenile idiopathic arthritis: is there a potential modulating role for OPG/RANK-L in bone injury? *J Rheumatol*. 2004;31(5):986-991.
- [18] Arko B, Prezelj J, Komel R, et al. Sequence variations in the osteoprotegerin gene promoter in patients with postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(9):4080-4084.
- [19] Zajíčková K, Zemanová A, Hill M, et al. Is A163G polymorphism in the osteoprotegerin gene associated with heel velocity of sound in postmenopausal women? *Physiol Res*. 2008;57 Suppl 1: S153-157.
- [20] García-Unzueta MT, Riancho JA, Zarrabeitia MT, et al. Association of the 163A/G and 1181G/C osteoprotegerin polymorphism with bone mineral density. *Horm Metab Res*. 2008; 40(3):219-224.

来自本文课题的更多信息——

基金资助: 北京大学人民医院研究与发展基金交叉课题 (RDI2008-02), 多学科联合进行骨质疏松研究。

作者贡献: 所有作者共同设计、实施及评估实验。

致谢: 感谢北京大学人民医院中心实验室何培英、张育军在实验技术方面给予的支持和帮助。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 本研究经北京大学人民医院伦理委员会批准, 研究对象已签署“知情同意书”。

本文创新性: 骨质疏松症为多基因复杂遗传病, 护骨素作为骨质疏松症重要的候选基因, 其基因多态性与骨量代谢的相关, 同时, 近年来研究显示护骨素基因多态性与骨质疏松症的相关性存在种族差异, 多数研究为白种绝经后女性人群, 缺少中国汉族人群研究, 特别是男性人群研究证据。

Mesh 词表主题词扩展: 输精管吻合术-vasovasostomy (本刊英文部)

Only two conditions must be satisfied for sperm to be returned to a patient's semen with vasectomy reversal by vasovasostomy. First, the patient must have sperm available to pass through at least one reconnection. The second condition is that each reconnection must be as watertight as possible. The surgeon's goal is to achieve a very precise circumferential reconnection of the sperm canal edges by using meticulously placed microsurgical sutures.

精子由精曲小管通过附睾、输精管、精囊、射精管、尿道, 随射精而排出, 输精管道不仅是

精子的通路, 而且具有使精子成熟并获得活力的功能。当输出通道中的任何一处发生阻塞时, 如附睾、输精管局限性缺如或纤维化以及输精管结扎等, 都能阻止精子的排出, 导致输精管梗阻性不育。据报道, 输精管道梗阻在男性不

育中约占 10%~15%, 而在无精子症中则可达 40%以上。因此, 输精管道梗阻是造成男性不育的常见原因之一。在所有治疗梗阻性无精子症的方法中, 输精管吻合术是治疗梗阻性无精子症最为常见和有效的方法

英文主题词	Vasovasostomy
英文注释	Surgical anastomosis or fistulization of the spermatic ducts to restore fertility in a previously vasectomized male.
中文主题词	输精管吻合术
中文注释	为了使以前切除输精管的男性恢复生育力而实施的输精管外科吻合术或造瘘术。