

· 现场调查 ·

雌激素受体基因多态性与青春期少女
骨骼发育状况相关性研究

杨丽琛 朴建华 董杰 黄振武 张倩 马冠生

【摘要】 目的 了解青春期女性中雌激素受体(ER- α)基因多态性的分布频率;探讨其对少女骨密度(BMD)和骨转换生化指标的影响,及是否存在弱势 ER 基因型别的群体。**方法** 选取年龄 12~14 岁、无相关疾病的健康志愿者 158 名。采用(1)聚合酶链反应-限制性片段长度多态性法对 ER- α 进行多态性分析;(2)双能 X 线吸收仪测量全身及前臂的 BMD;(3)进口酶联免疫检测试剂盒测定骨转换生化指标(骨钙素 BGP、骨碱性磷酸酶 BAP、抗酒石酸酸性磷酸酶 TRACP)和钙调激素(活性维生素 D、雌二醇)水平。分析 ER- α 基因多态性与机体 BMD 及骨转换生化指标的相关性。**结果** (1)各骨转换生化指标在 ER- α 基因型别间差异无统计学意义,但其在 Pvu II 的各基因型别间表现出 pp>PP>Pp 的趋势。在 Xba I 各基因型别间未见明显趋势。Px 单倍体组与 non-Px 组间也未显示出差异($P>0.05$);(2)未见 ER- α 基因型别间全身及前臂 BMD 的差异有统计学意义($P>0.05$),non-Px 单倍体组各部位的 BMD 普遍大于 Px 单倍体组,但两组间的差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 中国青春期少女的 ER- α 基因多态性未显示出对其骨骼生长发育(BMD 和骨转换生化指标)有明显影响,该基因型可能不是主要影响该人群的遗传因素。

【关键词】 雌激素受体基因多态性;青春期少女;骨骼发育

Study on the association between estrogen receptor- α gene polymorphisms and pubertal skeletal developmental status in China YANG Li-chen, PIAO Jian-hua, DONG Jie, HUANG Zhen-wu, ZHANG Qian, MA Guan-sheng. Institute of Nutrition and Food Safety, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China

【Abstract】 Objective To investigate the association between estrogen receptor- α (ER- α) gene polymorphisms, pubertal bone mineral density (BMD) and bone turnover markers, to better understand the frequencies of ER- α genotypes. **Methods** The ER- α Pvu II and Xba I genotypes were determined by PCR-RFLP in 158 healthy adolescent girls (12-14 years old) while BMD was measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA). The bone turnover markers (BAP, BGP, TRACP) and calcium adjust hormone (25-OH-VitD, E2) were detected by ELISA. The relationship among BMD, bone turnover markers, and polymorphisms of ER- α were examined. **Results** (1) Although the bone turnover markers had a trend in ER- α Pvu II genotypes as pp>PP>Pp but no significant difference was found ($P>0.05$). There were no significant differences found among Xba I genotypes and between Px haplotype and non-Px haplotype. (2) No association was noticed between ER- α genotype and BMD at any site of the forearm and the whole body. Compared with non-Px haplotype, the Px haplotype had lower BMD, but there was no significant difference noticed ($P>0.05$). **Conclusion** ER- α gene Pvu II and Xba I polymorphism seemed not potentially influence on BMD and bone turnover markers in the pubertal girls in Beijing, suggesting that it might not be the major genetic factor regarding this population.

【Key words】 Estrogen receptor- α gene polymorphism; Pubertal girls; Skeletal development

骨质疏松症是全球性的公共卫生问题,现有的研究成果提示,遗传因素可决定 80% 的骨密度(BMD)的变异^[1]。由于雌激素对骨骼的发育、峰值骨量的达到,以及骨量的丢失均起重要作用,因此雌

激素受体基因(ERG)多态性与 BMD 的关系也在众多的候选基因中备受关注。在以往有关 ERG 多态性与骨骼健康的报道中,多集中在绝经期前后的妇女,而对处于生长发育第二高峰期的青春期女性鲜有报道。然而,这一阶段摄入充足的钙,并获得遗传许可范围内的最大峰值骨密度(PBMD),是维持骨骼健康及预防中老年发生骨质疏松等疾病的关键。

基金项目:2004 年中国营养学会营养科研基金资助项目

作者单位:100050 北京,中国疾病预防控制中心营养与食品安全所

那么 ERG 多态性对处于快速生长期的青春期少女来说,究竟发挥怎样的作用?是否存在某种弱势基因型别人群?本研究将着重探讨我国青春期少女的骨骼健康状况与其 ERG 多态性的关系,以早期发现骨质疏松症的高危人群。

对象与方法

1. 研究对象:2005 年 3 月,在北京市怀柔地区 2 所学校的住宿中学生中征集志愿者进行该课题研究。入选标准:年龄 12~14 岁,经体检无骨关节、内分泌及代谢性疾病,无骨折史,不补充钙制品;且能积极配合者为受试对象。此项研究得到了中国疾病预防控制中心医学伦理委员会的同意。

2. 方法:

(1)全血 DNA 的提取:抽取志愿者任意时期的 5 ml 静脉血,肝素抗凝,分离血浆和白细胞,前者用于生化指标的测定,后者用于提取 DNA 进行基因型别的分析。小量血液 DNA 提取试剂盒为上海华舜生物工程公司产品。

(2)ER 基因片段扩增及限制性酶切分析:根据参考文献[2]由上海生工生物工程有限公司合成引物。ER- α 的 Pvu II 上游引物是 5'-CTG CCA CCC TAT CTG TAT CTT TTC CTA TTC TCC-3',下游引物是 5'-TCT TTC TCT GCC ACC CTG GCG TCG ATT ATC TGA-3'。50 μ l PCR 反应体系含上下游引物 (0.2 μ mol/L) 各 1 μ l, 10 mmol/L dNTP 1 μ l, DNA 模板 2 μ l, Taq DNA 聚合酶 2 μ l。扩增条件:94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 61 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 共 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物长度为 1.3 kb,应用限制性内切酶 Pvu II、Xba I 对产物进行酶切。根据酶切后电泳条带,将 ER 的基因型表示为 PP(无 Pvu II 酶切位点,1.3 kb 一条电泳带)、pp(有 Pvu II 酶切位点,850 bp、450 bp 两条电泳带)、Pp(杂合子,有 1300 bp、850 bp、450 bp 三条电泳带);XX(无 Xba I 酶切位点,1.3 kb 一条电泳带)、xx(有 Xba I 酶切位点,900 bp、400 bp 两条电泳带)、Xx(杂合子,有 1300 bp、900 bp、400 bp 三条电泳带)。

联合分析 Pvu II 和 Xba I 基因型,根据 Px 单倍体的有无,将人群分为两组,Px 单倍体组 (PPxx, Ppxx, PPXx) 和 non-Px 单倍体组 (PPXX, ppXX, ppxx, ppXx, PpXX); PpXx 的单倍体类型无法确定,故未纳入研究对象。

3. 血浆中骨转换生化指标的测定:取血浆用酶联

免疫分析方法进行骨特异性碱性磷酸酶 BAP(英国 IDS 公司)、骨钙素 BGP(美国 DSI 公司)、人抗酒石酸性磷酸酶 TRACP-5b(英国 IDS 公司)的测定。

4. BMD 测定:使用美国 NORLAND XR-36 型双能 X 线吸收仪(精密度 < 1%)测量全身及前臂的 BMD。测定由 2 名专职技师负责,每次测前均进行仪器性能校正检测,变异系数 (CV) = 0.56% ~ 0.65%。

5. 激素水平的测定:用放射性免疫方法测定血清中活性维生素 D (25-OH-VitD, 美国 DiaSorin 公司)、雌二醇 (E2, 北方公司) 水平。

6. 统计学分析:采用 SPSS 10.5 软件进行统计学处理。 χ^2 检验分析 ER- α 各等位基因频率是否符合 Hardy-Weinberg 定律;两组间计量资料的比较采用独立样本的 t 检验,多组间计量资料比较在控制协变量的基础上采用协方差分析。

结果

1. 一般情况:158 名志愿者的平均年龄 (13.52 $\pm$ 0.71) 岁,身高 (156.69 $\pm$ 6.67) cm,体重 (48.41 $\pm$ 9.79) kg,体重指数 (BMI) (19.64 $\pm$ 3.45) kg/m²。

2. ER- α 等位基因频率分布:ER- α 基因 Pvu II、Xba I 等位基因频率均符合 Hardy-Weinberg 定律 ($P > 0.05$),见表 1,说明此人群具有代表性。

表 1 ER- α 基因 Pvu II、Xba I 等位基因频率的分布

项目	Pvu II ^a			Xba I ^b		
	PP	Pp	pp	XX	Xx	xx
观察值 (n=158)	20 (12.7)	76 (48.1)	62 (39.2)	7 (4.4)	47 (29.8)	104 (65.8)
理论值	21.3	73.4	63.3	5.9	49.3	102.9

注:括号内数据为构成比(%);^a $\chi^2 = 0.198, P = 0.906$; ^b $\chi^2 = 0.324, P = 0.850$

3. ER- α 等位基因型别对骨转换生化指标和钙调激素的影响:

(1)ER- α Pvu II、Xba I 等位基因型别对骨转换生化指标和钙调激素的影响:见表 2。

用协方差分析经 BMI、青春期乳房发育状况调整后,各等位基因型别间的骨转换生化指标和钙调激素水平。结果显示:①各骨转换生化指标在各基因型别间的差异无统计学意义,但其在 Pvu II 的各基因型别间表现出 pp > PP > Pp 的趋势。在 Xba I 各基因型别间未见明显趋势。② 25-OH-VitD、雌二醇 (E2) 水平及受试者的年龄、身高、体重在 Pvu II、Xba I 各基因型别间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表2 ER-α 基因 Pvu II、Xba I 多态性对骨转换生化指标和钙调激素的影响($\bar{x} \pm s$)

因 素	Pvu II			Xba I		
	PP	pp	Pp	XX	xx	Xx
年龄(岁)	13.39±0.83	13.56±0.69	13.50±0.70	13.39±0.54	13.49±0.73	13.57±0.72
身高(cm)	156.04±6.21	157.87±5.98	155.90±7.24	159.87±4.83	156.61±7.01	156.39±6.09
体重(kg)	46.76±6.96	49.67±11.12	47.82±9.24	49.07±5.80	48.07±10.04	49.07±9.80
BMI(kg/m ²)	19.13±2.10	19.82±3.69	19.64±3.56	19.21±2.28	19.53±3.63	19.96±3.21
TRACP(U/L) ^a	10.80±4.22	11.37±5.02	9.93±4.30	9.09±3.83	10.38±4.00	11.37±4.69
BAP(U/L) ^b	47.33±21.08	49.29±28.83	46.46±29.08	40.72±15.40	48.66±29.84	48.03±24.85
BGP(U/L) ^c	27.66±14.86	28.72±16.26	26.48±8.92	7.13±13.27	28.33±11.77	27.10±12.81
雌二醇(pg/ml) ^d	76.84±42.05	83.32±38.46	87.64±41.32	72.63±41.19	86.54±39.21	82.02±42.76
25-OH-VitD(ng/ml) ^e	20.24±8.99	14.98±8.12	15.51±9.90	21.36±7.13	15.50±8.73	15.71±10.29

注:^{a,b,c}检测人数均为 142 人,其中 PP、pp、Pp 分别为 20、55 和 67 人;XX、xx、Xx 分别为 7、93 和 42 人;^d检测人数为 132 人,其中 PP、pp、Pp 分别为 18、51 和 63 人,XX、xx、Xx 分别为 7、87 和 38 人;^e检测人数为 110 人,其中 PP、pp、Pp 分别为 11、43 和 56 人,XX、xx、Xx 分别为 4、71 和 35 人

(2)联合分析 ER-α Pvu II、Xba I 基因型别对骨代谢生化指标和钙调激素的影响:见表 3。Px 单倍体组和non-Px单倍体组间年龄、身高、体重、BMI、各骨转换生化指标、25-OH-VitD 和 E2 水平的差异均无统计学意义($P>0.05$)。

4. ER-α 基因多态性对全身及前臂 BMD 的影响:运用协方差分析,以 BMI、青春乳房发育状况校正,对 ER-α 基因型与 BMD 的关系进行探讨。结果显示:①未发现 ER 基因 Pvu II 各等位基因型别间的全身及前臂 BMD 存在差异($P>0.05$);②未发现 ER 基因 Xba I 各等位基因型别间的全身及前臂 BMD 存在差异($P>0.05$);③联合分析 Pvu II、Xba I 基因型别:non-Px单倍体组各部位的 BMD 普遍大于 Px 单倍体组(表 4),但两组间的差异无统计学意义($P>0.05$)。

讨 论

本研究中,ER-α 受体 Pvu II、Xba I 等位基因型

别分布结果和国内外结果接近,与日本和朝鲜的人群分布相近,都是 X、P 最少,而 p、x 占绝大多数,但与白种人有显著区别^[3,4]。

本研究未发现受试对象全身及前臂的 BMD 与 ER-α Pvu II、Xba I 基因多态性有关。Px 单倍体的 BMD 虽比non-Px单倍体型略低,但差异未表现出统计学意义。分析原因,首先年龄在研究ER-α与 BMD 的关系时不能忽视。早在 1996 年日本学者就报道了 ER 基因多态性与绝经后妇女 BMD 存在相关性^[5],随后的众多研究也主要针对绝经期前后的妇女,但研究结果不尽相同^[6-8]。在对青年女性的研究中,有报道ER-α基因型别独立并与 VDR 基因联合影响女性某些部位的峰值骨量(PBMD)^[2],但也有不少研究未发现妇女 PBMD 与 ER-α 基因 Pvu II、Xba I 多态性有关^[9]。对青春女性的研究报道很少。此外,Px 单倍体与 BMD 的关系可能也与年龄相关。在那些发现 Px 单倍体与 BMD 有相关性的报道中,人群的年龄均在 64 岁左右,估计 Px 可能与

表3 ER-α Px 单倍体型对骨代谢生化指标和钙调激素的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	年龄(岁)	身高(cm)	体重(kg)	BMI(kg/m ²)	TRACP(U/L)	BAP(U/L)	BGP(U/L)	E2(pg/ml)	25-OH-VitD(ng/ml)
Px 单倍体(n=53)	13.43±0.75	155.16±7.88	46.92±9.52	19.46±3.75	10.07±4.22	49.65±29.96	27.7±10.64	89.58±43.31	5.98±9.43
non-Px 单倍体(n=70)	13.53±0.68	157.86±5.85	49.54±10.71	19.77±3.55	11.34±3.98	47.93±27.75	28.11±12.78	82.32±38.22	15.52±8.14

表4 ER-α Px 单倍体型对 BMD 的影响

分组	BMD			
	全身	前臂远端 1/10 处	前臂远端 1/3 处	烧骨远端 1/3 处
Px 单倍体(n=53)	0.784±0.083	0.280±0.048	0.604±0.048	0.601±0.046
non-Px 单倍体(n=70)	0.804±0.078	0.293±0.045	0.614±0.061	0.609±0.061

绝经后的骨量丢失有关^[10]。而本研究的观察对象为青春期少女,平均年龄仅13.5岁,在此阶段可能遗传因素对个体 BMD 的影响未表现出明显作用,而其他的一些非遗传因素,如身高、体重、BMI、青春期发育状况、体力活动水平等都会影响骨量的增长。在本研究进行的 BMD 与相关因素的多元回归分析结果显示,全身及前臂远端的 BMD 与体重、BMI、青春期乳房发育状况均呈正相关(数据未显示)也证明了这一点。而一项对青春期女孩的研究还表明,基因型会影响体育活动强度与负重部位骨量的关系,ER 的 Pp 基因型更容易从体育锻炼中获益,而且高体育活动可以掩盖遗传因素对骨质的影响^[11]。由于在本研究中未对志愿者的体力活动水平进行评估,因此也很难就这些混杂因素的作用作出结论。

在评价个体的骨骼发育状况时,除了用 BMD 的变化反映外,骨代谢的生化指标也有一定的价值。前瞻性研究表明,用特异性的生化指标评价,可以看出骨吸收的增加与髌部和脊椎骨折的危险性相关,且独立于 BMD 之外^[12]。因此本研究也分析了 ER- α 基因多态性对反映骨吸收的指标(抗酒石酸酸性磷酸酶 TRACP)和骨形成的指标(血清骨钙素 BGP、骨碱性磷酸酶 BAP)的影响,结果未显示不同基因型别间的骨代谢生化指标存在差异,这可能也与本文的例数少有关。有关结果还需要进一步的实验验证。

总之,骨质疏松是多基因复杂疾病,为揭示其遗传基础,必须重视对多个基因多态性或某个基因多态位点之间骨量的协同作用。此外,为使青春期少女获得遗传许可范围内的更好的 PBMD,还应充分考虑环境、膳食、体力活动等非遗传因素的影响。

(感谢解放军第三〇四医院康复与理疗科李玲主任、朱虹艳医生及核医学科刘加昌技师在骨量测定中给予的大力帮助)

参 考 文 献

- [1] Pocock NA, Eisman JA, Hopper JL, et al. Genetic determinants of bone mass in adults: a twin study. *J Clin Invest*, 1987, 80: 706-710.
- [2] 杨欣,郑淑荣,陈荣京,等. 北京地区青年峰值骨密度与遗传因素的相关性分析. *中华妇产科杂志*, 2003, 38: 273-276.
- [3] Han K, Choi J, Moon I, et al. Non-association of estrogen receptor genotypes with bone mineral density and bone turnover in Korean pre-, peri-, and postmenopausal women. *Osteoporosis Int*, 1999, 9: 290-295.
- [4] 刘浩,刘志红,陈朝红,等. 雌激素受体基因多态性在中国汉族人群中的分布特点. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 1999, 8: 22-27.
- [5] Kobayashi S, Inoue S, Hosoi T, et al. Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen. *J Bone Miner Res*, 1996, 11: 306-311.
- [6] Fountas L, Anapliotou M, Komonakis A, et al. Estrogen receptor alpha gene analysis in osteoporosis and familial osteoporosis. *Osteoporosis Int*, 2004, 15: 948-956.
- [7] Takumi K, Hiroshi M, Masatoshi T, et al. Association of Vitamin D and estrogen receptor gene polymorphism with the effect of hormone replacement therapy on bone mineral density. *J Bone Miner Metab*, 2004, 22: 241-247.
- [8] Ongphiphadhanakul B, Rajatanavin R, Chanprasertyothin S, et al. Estrogen receptor gene polymorphism is associated with bone mineral density in premenopausal women but not in postmenopausal women. *J Endocrinol Invest*, 1998, 21: 487-493.
- [9] 何进卫,黄琪仁,章振林,等. 雌激素受体 α 和维生素 D 受体基因多态性与上海市妇女峰值骨量的关系. *中华内分泌代谢杂志*, 2004, 20: 140-142.
- [10] 董杰,黄振武,朴建华,等. 基因多态性及环境因素与绝经后妇女骨密度的相关性研究. *卫生研究*, 2006, 35: 196-200.
- [11] Miis S, Anitta M, Vuokko K, et al. Association between exercise and pubertal BMD is modulated by estrogen receptor α genotype. *J Bone Miner Res*, 2004, 19: 1758-1765.
- [12] Garnero P, Delmas PD. Contribution to bone mineral density and bone turnover markers to the estimation of risk of osteoporotic fracture in postmenopausal women. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2004, 4: 50-63.

(收稿日期:2006-12-06)

(本文编辑:张林东)

[1] Pocock NA, Eisman JA, Hopper JL, et al. Genetic determinants