

我国汉族妇女维生素 D 受体基因多态性和骨质疏松关系的研究

张红红 陶国枢 吴青 刘建伟 高宇红

摘要 旨在探讨维生素 D 受体 (VDR) 基因多态性与骨质疏松的关系, 采用聚合酶链反应限制性片段长度多态性技术对 162 例健康汉族中老年妇女和 17 例骨质疏松患者的 VDR 基因进行分型, 并计算其基因频率分布。结果: 正常对照组 VDR 基因 bb、Bb、BB 基因型分别为 91.36%、8.64%、0%; 骨质疏松组分别为 82.35%、17.65%、0%, 两组各型均无显著性差异。VDR 基因多态性具有种族差异性, 就目前调查例数而言, 我国汉族人骨质疏松与 BB 基因型无明显相关性。

关键词 维生素 D 受体 骨质疏松 基因型 聚合酶链反应

Preliminary Studies on the Relationship between Vitamin D Receptor Genepolymorphism and Osteoporosis in Chinese Women Zhang Honghong, Tao Guoshu, Wu Qing, et al. Department of Gerontology Institute, General Hospital of PLA, Beijing 100853

Abstract The relationship between vitamin D receptor (VDR) gene polymorphism and osteoporosis were studied. The polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism was used to detect VDR genotype in 162 healthy postmenopausal women and 17 patients with osteoporosis. The genotype frequencies of VDR were calculated later with Hardy-Weinberg equilibrium formula. The results showed that in controls, the bb, Bb and BB genotype accounted for 91.36%, 8.64%, and 0% respectively. Of those patients with osteoporosis, they were 82.35%, 17.65%, and 0% respectively. The results suggested that there was no association between VDR genotype and osteoporosis noticed.

Key words Vitamin D receptor Osteoporosis Genotype Polymeras chain reaction (PCR)

维生素 D 受体 (VDR) 基因多态性由位于 12q13 的等位基因控制, 1994 年 Morrison 等^[1] 研究报告, VDR 基因在内切酶 Bsm I、Apa I、Taq I 作用下, 呈限制性内切酶片段长度多态性, 并且与骨密度 (BMD) 密切相关, 而 BMD 水平的变化对骨质疏松起着重要作用, 这一领域的研究引起了国内外学者的广泛关注。本研究采用聚合酶链反应限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 技术检测 17 例骨质疏松患者和 162 例健康汉族中老年妇女, 旨在初步探讨 VDR 基因多态性和骨质

疏松的相关性。

材料和方法

一、研究对象:

1. 骨质疏松组: 我院门诊患者 17 例, 全部为绝经后女性, 平均 56.76 ± 2.8 岁。双能 X 线吸收仪 (DEXA) 检测腰椎低于同性别、同部位峰值骨密度 $2.0 \sim 2.5SD$ 。

2. 正常对照组: 我院体检人员 162 例, 平均 58.78 ± 3.0 岁, 绝经年限在 3 个月以上。

二、研究方法:

1. 提取 DNA: 取全血 2ml, 经典法^[2] 提取基因组 DNA。

2. PCR 扩增 VDR 基因: 引物按参考文

作者单位: 解放军总医院老年医学研究所 北京 100853

本文为国防科工委科技基金资助项目

献设计。序列为 P1, 5'-GAACCAAGACTAC AAGTACCGCGTCAGTGA-3'; P2, 5'-TGGC GGCAGCGGATGTACGTCTGC-3'。反应体系为 50 μ l, 其中含 10 \times 扩增缓冲液; dNTPs 各 200 μ mol/L; 引物 P1、P2 各 0.5 μ mol/L; 模板 DNA 3 μ l。置热循环仪 (Ericom INC) 中 95 $^{\circ}$ C 预变性 7min, 再加 Taq DNA 聚合酶 3U。按下列程序循环 35 次, 即 95 $^{\circ}$ C 变性 1min, 70 $^{\circ}$ C 退火 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2min, 最后于 72 $^{\circ}$ C 再延伸 7min。取产物 5 μ l 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙啶 (EB) 染色, 紫外灯下观察扩增是否成功。

3. 扩增产物的限制性酶切: PCR 扩增产物 10 μ l (约 0.3 μ g) 直接用 3U Bsm I 酶切, 65 $^{\circ}$ C, 过夜。反应终止后, 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色 40min, 以 DNA 片段长度标准物为参考, 紫外检测仪下观察结果并照像。VDR 基因判定参照文献^[3]方法, 即缺乏相应酶切位点为 BB 型 (1 850bp), Bb 型 (1 850、1 200、650bp) 为杂合子, bb 型 (1 200、650bp) 则代表存在相应酶切位点的等位基因。

4. BMD 测定: 双能 X 线吸收仪 (DEXA) 检测 BMD。

5. 统计学处理: 使用 SAS 软件包, 基因频率采用基因计数法计算, 基因型频率比较采用似然比 χ^2 检验。

结 果

一、PCR 扩增 VDR 基因: 模板 DNA 提取后, 经 PCR 扩增, 扩增出特异性片段 (1 850 bp)。

二、PCR-RFLP 法确定 VDR 基因: 共测定 162 例样品, 用限制性内切酶 Bsm I 检出 2 种不同基因型, 即 Bb、bb, 未检出 BB 等位基因。

三、VDR 基因型频率分布: 按 Hardy-Weinberg 平衡定律计算不同组别研究对象 VDR 基因型频率, 对照组中 VDR 基因型 bb、Bb、BB 分别为 91.36% (148/162)、

8.64% (14/162)、0%; 骨质疏松组分别为 82.35% (14/17)、17.65% (3/17)、0%, 两组均未检出 BB 基因型, 并且, 两组基因型频率比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。

四、不同人群中 VDR 基因型频率分布: 由附表可见, 我国健康汉族中老年妇女 VDR 等位基因频率与美国、澳大利亚、法国、日本差异有非常显著性 ($P < 0.001$)。中国汉族人以 bb 型最多, 占 91.36%, 美国、澳大利亚、法国, 该基因型占第二位 (28% ~ 32%)。韩国、日本则以此型最多, 在数值上与我国汉族较为接近, 但也有一定差别。

附表 不同人群 VDR 基因型频率分布

	bb	Bb	BB	作者及文献
中国汉人 (162 例)	91.36 (148)	8.64 (14)	0	本文
美 国 (85 例)	28 (24)	55 (47)	17 (14)	Hustmyer FG ^[4]
澳大利亚 (244 例)	28 (68)	50 (122)	22 (54)	Morrison NA ^[1]
法 国 (189 例)	32 (61)	51 (96)	17 (32)	Garnero P ^[5]
日 本 (102 例)	55 (56)	38 (39)	7 (7)	Yamagata Z ^[6]
韩 国 (70 例)	85.7 (60)	12.9 (9)	1.4 (1)	Lim SK ^[3]

注: 括号外数字为频率 (%), 括号内数字为例数。

讨 论

Morrison 等^[1] 研究认为, VDR 基因型可以预测骨质疏松。他们对白种人调查时, 发现 60 岁以上健康妇女, 75% 的 BB 基因型的 BMD 低于骨折阈, 而 61% 的 bb 基因型高于骨折阈, 骨质疏松的患者, BB 基因型表现极为活跃。

我们的研究结果, 中国健康汉族中老年妇女和骨质疏松患者 VDR 基因多态性的分布频率, 均以 bb 基因型最多, 分别为 91.36% 和 82.35%, 两组均未检测出 BB 基因型, 说明 BB 基因型还不能作为汉族人群预测骨质疏松的一项指标。

国外研究资料显示, 健康人群中, 美国、澳大利亚、法国以 Bb 基因型最多, 其次为 bb

型,而韩国、日本则以 bb 基因型最多,其次为 Bb,这与本研究结果较为接近,但与日本仍相差显著。这种基因多态性分布频率的差异可能与入种有关,美国、澳大利亚、法国为高加索(Caucasoid)入种,中国、韩国、日本为亚洲国家,同属蒙古(Mongoloid)入种,因此,种族间的差异使我们对骨质疏松流行病学和病理生理有了进一步的认识。

综上所述,就目前调查例数而言,中国汉族人骨质疏松与 BB 基因型无相关性,但是,对 VDR 基因多态性的研究,使我们从基因水平上认识不同种族间骨质疏松发病机制的差异,这对骨质疏松病因学和防治具有重要意义。

参 考 文 献

1 Morrison NA, Qi JC, Tokita A, et al. Prediction of bone

density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 1994; 367: 284.
 2 Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989: 931-958.
 3 Lim SK, Park YS, Park JM, et al. Lack of association between vitamin D receptor genotypes and osteoporosis in Koreans. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 3677.
 4 Hustmyer FG, De Luca HF, Peacock M, Apa I, Bsm I, EcoRV and Taq I polymorphism at the human vitamin D receptor gene locus in Caucasians, Blacks and Asians. *Human Molecular Genetics* 1993; 2: 487.
 5 Garnero P, Borel O, Sorney-Rendu E, et al. Vitamin D receptor gene polymorphism do not predict bone turnover and bone mass in healthy premenopausal women. *J Bone Mineral Res* 1995; 10: 85.
 6 Yamagata Z, Miyamura T, Iijima S, et al. Vitamin D receptor gene polymorphism and bone mineral density in healthy Japanese women. *Lancet* 1994; 344: 1027.

(收稿: 1997-05-14 修回: 1997-09-28)

老年人异常心电图 129 例临床分析

赵慧荣 林文萍

我们于 1996 年 10 月对林西矿离休干部 234 人的体检中,发现异常心电图 129 例。现分析如下。

一、临床资料:异常心电图 129 例中,男性 120 例,女性 9 例,年龄均为 60 岁以上,最大者 87 岁。基础疾病中,以冠心病占首位,其次为脑血管病、肺心病、高血压、高心病、慢支等。

二、结果:异常心电图 129 例中,其中缺血性心肌损害 73 例次,心肌梗塞 3 例次,左室肥厚 8 例次,左室高电压 13 例次,P 波改变 7 例次,心房纤颤 4 例次,期前收缩 15 例次,房室传导阻滞、室内阻滞 20 例次,肢导低电压 12 例次,窦性心动过速 12 例次,窦性心动过缓 11 例次。

三、讨论:129 例老人中心电图变化 178 例次,以缺血性心肌损害为多,其次为心律失常。从病种统计来看,冠心病占数最多,心电图异常检出率最高。第二位为脑血管病,其次为肺心病、高血压、慢支等。其原因:①冠心病等缺血性心肌损害、窦缓均与高

龄,冠状动脉退行性和增生性病变,致管壁增厚、变硬失去弹性,管腔缩小心肌缺血缺氧有关;②老年人随着增龄,心脏呈退行性变,纤维化和钙化,心房心室扩大,易引起房性、室性心律失常;③老年人各脏器功能低下,免疫功能降低,易患多种感染性疾病。感染、劳累等,更易诱发心衰,心衰又加重心律失常的发生;④老年人脑血管病多见,脑缺血或颅内高压,特别是颅内出血压迫局部及缺氧时,可出现一系列心电图变化。老年人冠状动脉与脑动脉粥样硬化常同时累及,故脑血管病人心电图以缺血性改变为多;⑤肺心病人均有不同程度的低氧血症,缺氧可使氧分压下降,对心肌有直接损害,可使心肌兴奋性增强,引起心律失常;⑥脑部病变导致病人昏迷、脑水肿、休克、高热及应用大量脱水降压药等多种因素的影响,肺心病人低氧血症,利尿剂应用常常继发性使病人体内电解质紊乱,酸碱平衡失调,尤其是钾的异常,促使心脏异位节律点兴奋性增高,激发致命性心律失常的发生。