

褪黑素受体 1B 基因多态性与青少年骨密度的相关性

邱旭升 邓亮生 杨晓恩 郭凯琪 李广文 秦岭 邱勇 郑振耀

摘要：目的 探讨褪黑素受体 1B 基因(MTNR1B)多态性与骨密度之间的相关性。方法 选取 140 名 16~20 岁之间的正常女性,采用双能 X 线骨密度吸收仪测量双侧近端股骨的骨密度。同时,采取外周静脉血,采用试剂盒提取 DNA。根据人类单倍体图计划(HapMap)提供的汉族人数据,我们在 MTNR1B 基因上选取了 6 个标签 SNP(tagSNPs)。通过 PCR-RFLP 的方法检测褪黑素受体 1B 基因上 6 个标签 SNP 的基因型。采用 ANOVA 的统计学方法比较不同基因型对应骨密度大小。结果 MTNR1B 基因 6 个多态性位点各基因型所对应的骨密度,没有明显差异($P > 0.05$)。结论 褪黑素受体 1B 基因多态性与骨密度之间没有相关性。

关键词：褪黑素受体 1B ; 基因多态性 ; 骨密度

Association between melatonin receptor 1B gene polymorphisms and bone mineral density in adolescents

QIU Xusheng , TANG Leungsang , YEUNG Hiuyan , et al . Spine Surgery , The Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School , Nanjing 210008 , China

Abstract: **Objective** To investigate the association between melatonin receptor 1B (MTNR1B) gene polymorphism and bone mineral density in adolescents. **Methods** 140 normal healthy girls aged 16-20 years were recruited for this study. Bone mineral density (BMD) measurements of the bilateral proximal femora were performed by dual energy X-ray absorptiometry (DXA). Peripheral bloods were collected , and genomic DNAs were extracted using a commercial available kit. Using the Chinese data of the Hapmap Project , 6 tagSNPs were selected for MTNR1B gene. Genotyping were performed by PCR-RFLP. ANOVA was used for the comparison of bone mineral density of different genotypes. **Results** Bone mineral densities of different genotypes were comparable for all the six polymorphisms in MTNR1B gene ($P > 0.05$). **Conclusion** No association is found between the polymorphisms of MTNR1B gene and bone mineral density.

Key words : Melatonin receptor 1B ; Gene polymorphism ; Bone mineral density

褪黑素是松果体分泌的主要激素,它有着广泛的生物学作用,对生物的昼夜节律、睡眠、性成熟及生殖、免疫反应、肿瘤、衰老等均有调节作用^[1]。褪黑素作为一种全身性的激素,随着年龄的增加而降低^[2],它对于成骨细胞和破骨细胞的作用以及在绝经后妇女及老年性骨质疏松中的作用渐渐引起了人

们的关注。最近已经有人提出将褪黑素作为预防治疗骨质疏松的药物^[3]。褪黑素的生物学作用主要通过结合褪黑素受体进行。在哺乳动物,褪黑素受体分褪黑素受体 1A(MTNR1A)和褪黑素受体 1B (MTNR1B)两个亚型^[4]。有研究表明,在成骨细胞及破骨细胞中,主要表达 MTNR1B 受体^[5]。笔者旨在研究 MTNR1B 基因多态性与青少年骨密度的相关性。

1 资料和方法

1.1 研究对象

140 名 16~20 岁之间的正常女性,全部为另外一项关于特发性脊柱侧凸研究的正常对照。排除患有严重的器质性内分泌疾病、神经系统疾病和骨代

基金项目:香港研资局基金(RGC grants) CUHK4337/04M)

作者单位:210008 南京大学医学院附属鼓楼医院脊柱外科 (邱旭升、邱勇),香港中文大学病理化学系(邓亮生),香港中文大学医学院矫形外科及创伤学系(杨晓恩、郭凯琪、秦岭、郑振耀),香港中文大学医学院利希慎临床医学研究实验室(李广文)

通讯作者:邱勇,Email : scoliosis2002 @ sina . com ;郑振耀,Email : jackcheng @ ort . cuhk . edu . hk

谢疾病 ,且无长时间活动受限或大量运动者 ,近年未用过影响骨代谢的药物(降钙素、氟化物、活性维生素 D 制剂、皮质激素等) ,在骨密度测定前未接受过任何治疗。

本研究对象本人及其家长签署同意书 ,同时本课题获得香港中文大学临床研究伦理委员会批准通过。

1.2 骨密度测量

采用双能 X 线骨密度吸收仪(XR-36 , Norland Medical System Inc , Fort Atkinson , Wisonsin , USA)测量双侧近端股骨的骨密度(bone mineral density , BMD)。仪器由专人操作 ,每日开机后均用体模矫正。按照事先本中心髌部扫描的测量误差是 1.5 %^[6]。股骨颈的 BMD 通过扫描区总的骨量(g)除以扫描的骨面积(cm²)得到 ,单位是 g/cm²。

1.3 基因型鉴定

采取外周血 3 ml ,基因组 DNA 采用试剂盒(Roche , USA)提取 ,具体操作步骤参照说明书。结合汉族人单倍体型资料^[7] ,选取 6 个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms , SNPs)位点 ,这 6 个 SNPs 覆盖了整个 MTNR1B 基因。它们分别是 rs2166706 , rs7941837 , rs4753426 , rs10830963 , rs3781637 ,rs10830964。由于基因上游启动子区的多

态性最有可能是功能性的 ,会引起基因表达水平的改变。因此 ,对于位于 MTNR1B 基因启动子区的 rs7941837 ,rs4753426 两个多态性 ,我们检测了所有的样本 ,而其他的几个多态性位点 ,我们只检测了部分的样本。

我们采用 PCR-RFLP 的方法对所选取的 SNPs 进行基因分型。表 1 列出了 PCR 反应扩增包含这些 SNPs 片段时所用的引物 ,退火温度 ,PCR 反应产物的大小 ,以及所用的内切酶和酶切后限制性片段大小。每一个 PCR 反应(最终反应物总体积 12.5 ml)包括 MBI Taq 酶 0.3 U ,引物 1.0 ml ,20 mM Tris-HCl(pH 8.4) ,50 mM KCl 以及 2.0 mM MgCl₂ ,总共进行 35 个循环 ,每个循环包括 96℃ 30 s ,60℃ 45 s ,72℃ 30 s 3 步 ,最后在 72℃延伸 10 min。取 7 μl PCR 反应产物 ,加入 3 U 相应的限制性内切酶及缓冲溶液(见表 1 ,所有 6 种内切酶都用 3 U) ,并加水使最终体积为 14 μl ,在每一个限制性内切酶相对应的最佳反应温度下 ,酶切过夜。酶切产物经 2% 或者 4% 琼脂糖(根据片段大小决定采用哪种浓度的琼脂糖)电泳分离 ,溴化乙锭染色 ,紫外灯下判断限制性片段长度多态性 ,以确定基因型(图 1)。10% 的样本进行了重复试验 ,以保证基因型鉴定的准确性。

表 1 PCR-RFLP 反应条件及限制性片段大小

SNPs	引物序列 5'-3'	退火温度 ℃	PCR 产物大小 bp	限制性 内切酶	酶切后产物大小 bp
rs2166706	Forward : TGCAGCAAAATGGAAGAAGTTG	60	277	TspRI	T : 277
	Reward : TGCCTGGCATGTGCTATTGG				C : 161 + 116
rs4753426	Forward : AACATATTTGTGATTAATCCAGGC	58	127	Hae III	T : 127
	Reward : TAACACCTGCAATTTCCACC				C : 104 + 23
rs7941837	Forward : ACTGTATCCATAATTTTGCTTTTC	60	139	EcoNI	A : 139
	Reward : AGCCATGATGCCATGAACCC				T : 115 + 24
rs10830963	Forward : ATGCTAAGAATTCACACCAGCT	58	125	Pvu II	C : 125
	Reward : CACAGTCGAGACTGTTTCTAATC				G : 105 + 20
rs3781637	Forward : TAGGTTCTTGGTGCTCTATTCGTG	60	412	Hinc II	G : 358 + 54
	Reward : TATTCCTATTTGTGCCCTGTCT				A : 185 + 175 + 54
rs10830964	Forward : TCCCTGTGATTATTGACG	60	662	Ava I	T : 662
	Reward : GCTAAGATTGCCAGAGTG				C : 439 + 223

1.4 统计学处理

等位基因的频率采用 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律进行检验 ,了解各基因频率是否为遗传平衡 ,具有群体代表性。不同基因型所对应骨密度的比较采用 ANOVA 检验方法 ,以 P < 0.05 为差异显著。所有数据统计均采用 SPSS 13.0 进行分析。

2 结果

2.1 MTNR1B 基因多态性位点频率分布情况

MTNR1B 各多态性位点基因型频率分布情况如表 2 所示。MTNR1B 基因 6 个多态性位点的基因型分布都符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律。

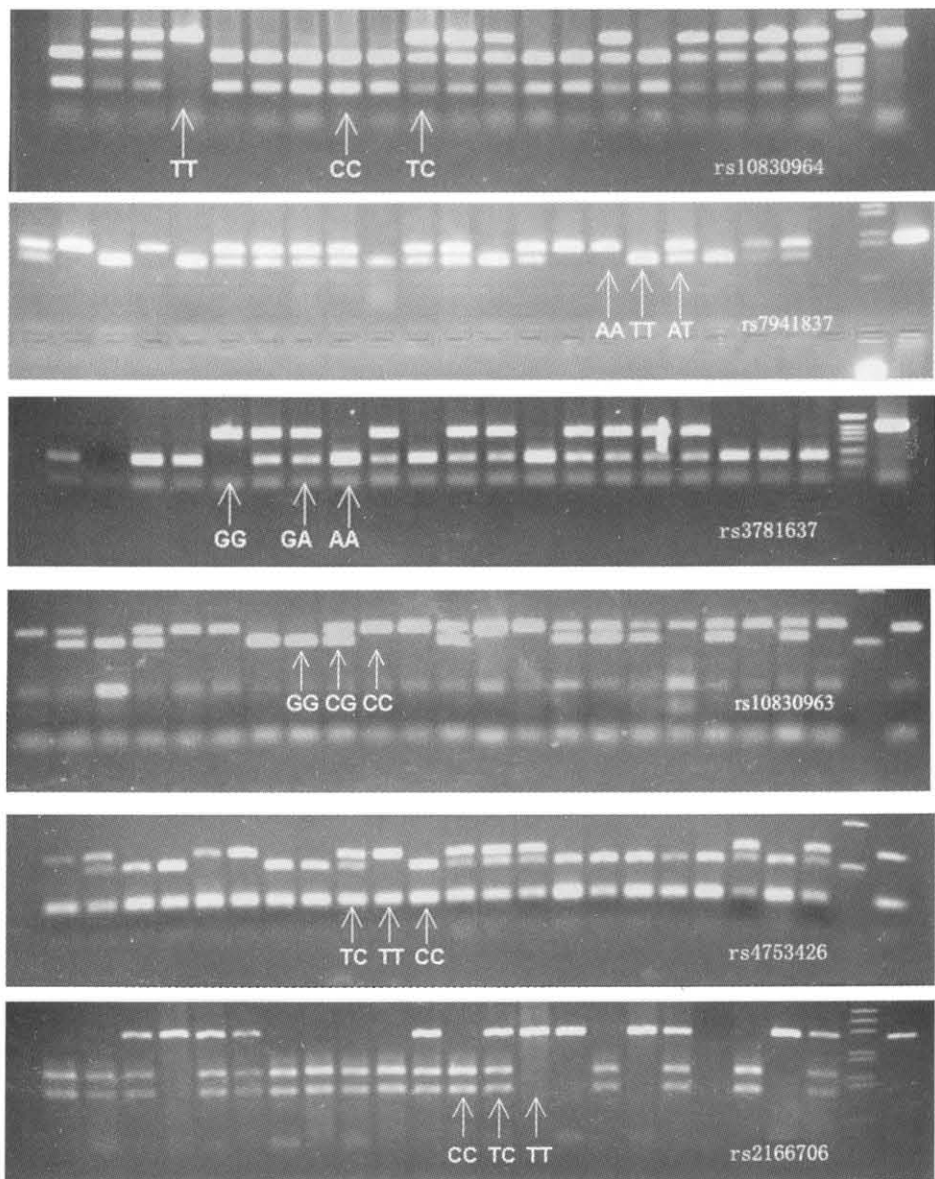


图 1 MTNR1B 基因 6 个 SNP 位点电泳图
注:左边第一道为酶切前的 PCR 产物,左边第二道是 Marker。每个 SNP 各个基因型如图示

表 2 MTNR1B 基因各多态性位点基因型频率分布情况

SNPs	n	基因型	频数	频率(%)	SNPs	n	基因型	频数	频率(%)
rs2166706	74	TT	16	21.62	rs10830963	68	CC	22	32.35
		TC	38	51.35			CG	31	45.59
		CC	20	27.03			GG	15	22.06
rs7941837	130	AA	34	26.15	rs3781637	72	GG	2	2.78
		AT	62	47.70			GA	19	26.39
		TT	34	26.15			AA	51	70.83
rs4753426	140	TT	8	5.71	rs10830964	73	TT	3	4.11
		TC	62	44.29			TC	27	36.99
		CC	70	50.00			CC	43	58.90

rs2166706 , rs7941837 , rs4753426 , rs10830963 , rs3781637 ,rs10830964 位点分别以 TC(51.35%) ,AT (47.69%) , CC (50.00%) , CG (45.59%) , AA (70.83%) ,CC(58.90%)基因型所占比例最高。

2.2 MTNR1B 基因多态性与骨密度相关性分析

MTNR1B 基因 6 个多态性位点各基因型所对应骨密度情况如表 3 所示。从表中可以看到 ,MTNR1B 基因 6 个多态性位点 ,每个位点各基因型所对应的骨密度 ,在左右两侧差异都无统计学意义($P > 0.05$)。

表 3 MTNR1B 基因多态性位点各基因型所对应骨密度情况($\bar{x} \pm s$)

SNPs	LFBMD				RFBMD			
	基因型	n	BMD	P	基因型	n	BMD	P
rs2166706	TT	16	0.840 ± 0.120	0.463	TT	16	0.852 ± 0.114	0.605
	TC	38	0.873 ± 0.096		TC	38	0.869 ± 0.085	
	CC	20	0.847 ± 0.094		CC	20	0.844 ± 0.095	
rs7941837	AA	34	0.881 ± 0.118	0.850	AA	34	0.867 ± 0.098	0.995
	AT	62	0.868 ± 0.111		AT	62	0.867 ± 0.102	
	TT	34	0.870 ± 0.095		TT	34	0.869 ± 0.098	
rs4753426	TT	8	0.852 ± 0.099	0.774	TT	8	0.841 ± 0.066	0.673
	TC	62	0.868 ± 0.100		TC	62	0.866 ± 0.099	
	CC	70	0.877 ± 0.117		CC	70	0.873 ± 0.104	
rs10830963	CC	22	0.868 ± 0.103	0.821	CC	22	0.860 ± 0.107	0.797
	CG	31	0.863 ± 0.104		CG	31	0.864 ± 0.091	
	GG	15	0.846 ± 0.120		GG	15	0.843 ± 0.107	
rs3781637	GG	2	0.807 ± 0.122	0.419	GG	2	0.803 ± 0.115	0.427
	GA	19	0.885 ± 0.085		GA	19	0.881 ± 0.074	
	AA	51	0.854 ± 0.110		AA	51	0.854 ± 0.104	
rs10830964	TT	3	0.909 ± 0.034	0.374	TT	3	0.926 ± 0.005	0.300
	TC	27	0.839 ± 0.099		TC	27	0.842 ± 0.102	
	CC	43	0.866 ± 0.105		CC	43	0.863 ± 0.093	

注 LFBMD-左侧股骨颈 BMD ,RFBMD-右侧股骨颈 BMD

3 讨论

原发性骨质疏松症是老年人的一种常见病 ,一种全身性骨病。主要是骨量减低和骨超微结构的破坏 ,招致骨质疏松性增加和容易发生骨折。骨密度是骨质疏松症的一个重要预测因子 ,峰值骨量高 ,则不容易得骨质疏松症 ,峰值骨量低 ,则容易得骨质疏松症。对双胞胎的研究表明 ,峰值骨量有近 80% 可以用遗传因素来解释^[8]。同时 ,分离分析表明没有单一个基因对骨密度起决定性的作用 ,和其他多基因疾病一样 ,多个等位基因位点决定骨密度的大小 ,从而决定是否容易发生骨质疏松症。在已有的研究中 ,维生素 D 受体 ,雌激素受体以及 I 型胶原是研究最多的也是比较肯定的易感基因^[9]。

近来 ,褪黑素与骨质疏松之间关系受到越来越多人的关注。Ladizesky^[10]通过切除卵巢的小鼠实验 ,第一次证实在体内褪黑素可以减少骨丢失。Cardinali 等^[11]的研究同样表明 ,在一定浓度雌激素

条件下 ,药理剂量褪黑素可以阻止卵巢切除术后的异常骨重建。另外 ,有体外试验直接证明褪黑素对成骨细胞及破骨细胞的作用。Roth 等^[12]的研究直接检测到了褪黑素对成骨细胞的前体细胞及鼠的成骨样骨肉瘤细胞系的作用。成骨细胞前体细胞在 50 nM 的褪黑素的刺激下 ,细胞分化加速。两个细胞系在纳摩级的褪黑素作用下 ,骨涎(唾液)蛋白及其他的骨标志性蛋白如碱性磷酸酶、骨桥蛋白及骨钙素表达增加。Nakade 等^[13]的研究表明 ,褪黑素可以显著的促进人的骨细胞及人的成骨细胞系细胞的增殖 ,并且呈剂量依赖性 ,当褪黑素浓度为 50 nM 时 ,达到最大效应。另一个实验研究表明 ,在鼠的 MC3T3-E1 成骨细胞系中 ,褪黑素(5 ~ 500 μM)呈剂量依赖性的降低 RANK mRNA 的表达 ,增加 OPG mRNA 及蛋白的表达。作者因此认为 ,药理剂量的褪黑素 ,通过下调 RANK 介导的破骨细胞的形成和活性而使骨吸收减少 ,骨量增加^[14]。事实上 ,最近有学者提出将褪黑素作为治疗骨质疏松的一种药物。

本研究探讨了褪黑素受体 1B (MTNR1B) 基因多态性与骨密度的相关性。其结果表明 MTNR1B 受体上 6 个多态性位点都与骨密度没有相关性。在本研究中,我们通过人类基因组单体型图计划(HapMap Project)提供的中国人的资料^[7],选择了 MTNR1B 基因的一组标签 SNP (tagSNPs)。标签 SNP 可以覆盖一个基因上的单倍体变异,从而代表了一个基因上的大部分多态性。因此,这 6 个标签 SNP 与股骨颈骨密度没有相关性,也就表明 MTNR1B 基因上的所有多态性与股骨颈骨密度没有相关性。换句话说,这些多态性位点都是非功能性的,没有引起基因表达和功能的改变,或者即使引起了基因表达和功能的改变,但对骨密度没有什么影响。

当然,本研究的样本量比较小,其初步研究结果有待大样本的进一步证实。另外,鉴于褪黑素对骨骼系统的作用已经比较肯定,有必要研究褪黑素信号传导路上其他基因的多态性与骨密度的相关性,以期发现骨质疏松的易感基因。

【参 考 文 献】

- [1] Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, et al. Melatonin : Nature's most versatile biological signal ? FEBS J , 2006 , 273 :2813-2838.
- [2] Mishima K, Okawa M, Shimizu T, et al. Diminished melatonin secretion in the elderly caused by insufficient environmental illumination. J Clin Endocrinol Metab , 2001 , 86 :129-134.
- [3] Witt-Enderby PA, Radio NM, Doctor JS, et al. Therapeutic treatments potentially mediated by melatonin receptors : potential clinical uses in the prevention of osteoporosis , cancer and as an adjuvant therapy. J Pineal Res , 2006 , 41 :297-305.

- [4] von Gall C, Stehle JH, Weaver DR. Mammalian melatonin receptors : molecular biology and signal transduction. Cell Tissue Res , 2002 , 309 :151-162.
- [5] Azeddine B, Forget S, Wang DS, et al. Melatonin signalling negatively regulates osteoclast maturation and activity through transcriptional inhibition of rank expression. Osteoporos Int , 2006 , 17 :s228.
- [6] Cheng JC, Qin L, Cheung CS, et al. Generalized low areal and volumetric bone mineral density in adolescent idiopathic scoliosis. J Bone Miner Res , 2000 , 15 :1587-1595.
- [7] The International HapMap Project. Nature , 2003 , 426 :789-796.
- [8] Slemenda CW, Christian JC, Williams CJ, et al. Genetic determinants of bone mass in adult women : a reevaluation of the twin model and the potential importance of gene interaction on heritability estimates. J Bone Miner Res , 1991 , 6 :561-567.
- [9] Liu YJ, Shen H, Xiao P, et al. Molecular genetic studies of gene identification for osteoporosis : a 2004 update. J Bone Miner Res , 2006 , 21 :1511-1535.
- [10] Ladizesky MG, Cutrera RA, Boggio V, et al. Effect of melatonin on bone metabolism in ovariectomized rats. Life Sci , 2001 , 70 :557-565.
- [11] Ladizesky MG, Boggio V, Albornoz LE, et al. Melatonin increases oestradiol-induced bone formation in ovariectomized rats. J Pineal Res , 2003 , 34 :143-151.
- [12] Roth JA, Kim BG, Lin WL, et al. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. J Biol Chem , 1999 , 274 :22041-22047.
- [13] Nakade O, Koyama H, Aiji H, et al. Melatonin stimulates proliferation and type I collagen synthesis in human bone cells *in vitro*. J Pineal Res , 1999 , 27 :106-110.
- [14] Koyama H, Nakade O, Takada Y, et al. Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation. J Bone Miner Res , 2002 , 17 :1219-1229.

(收稿日期 :2007-04-23)