

# 老年男性维生素 D 受体基因 Fok1 多态性与骨质疏松关系的初步研究

张红红 胡亚卓 詹志伟 牟小芬 裴育 吴青 孟秀梅 崔志辉 陶国枢

**摘要:**目的 了解维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)基因 5'端启动子区 Fok1 酶切位点多态性与老年男性骨质疏松的关系。方法 应用聚合酶链反应限制性片段长度多态性技术(PCR-RFLP)对 66 例对照者和 26 例骨质疏松患者的 VDR 基因 Fok1 多态性进行分析,计算 Fok1 基因型和等位基因的分布频率。结果 对照组 Fok1 多态性 FF、Ff、ff 基因型分别为 42.42%、42.42%、15% ;骨质疏松组分别为 15.38%、50%、34.62% ,两组基因型的分布频率差异有显著性( $\chi^2 = 12.078, P = 0.002$ )。结论 就目前调查例数而言,正常老年男性的 VDR 基因 5'端启动子区 Fok1 酶切位点多态性与骨质疏松组比较差异有显著性意义。

**关键词:** 维生素 D 受体基因; 起始密码子; 遗传多态性; 骨质疏松; 老年男性

**Preliminary study of vitamin D receptor gene( Fok1 ) polymorphisms and its relationship with osteoporosis in elderly men** ZHANG Honghong, HU Yazhuo, ZHAN Zhiwei, et al. Institute of Geriatrics and Gerontology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

**Abstract:** **Objective** To study the relationship between the polymorphisms of vitamin D receptor gene( Fok1 ) its relationship with and osteoporosis in elderly men. **Method** VDR gene polymorphism analysis was performed with polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism in 66 control and 26 osteoporosis patients. The genotype frequencies of VDR were calculated later according to Hardy-Weinberg equilibrium formula. **Results** The frequencies of FF, Ff and ff genotype were 42.42%, 42.42% and 15% in the control group, and 15.38%, 50% and 34.62% in the osteoporosis group, respectively ( $\chi^2 = 12.078, P = 0.002$ ). **Conclusions** In elderly men, the osteoporotic subjects has different frequency distribution of VDR gene start codon polymorphism.

**Key words:** Vitamin D receptor gene; Start codon; Genetic polymorphism; Osteoporosis; Elderly men

近年来,维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)基因被认为是遗传调控骨和钙代谢的候选基因。1994 年 Morrison 等<sup>[1]</sup>首先报道 VDR 基因多态性与骨密度(bone mineral density, BMD)相关以及可以预测 BMD。以后有研究发现 VDR 基因 5'端启动子区(vitamin D receptor start codon, VDRSC)外显子 2 上存在 Fok1 酶切位点多态性,这一位点的多态性影响 VDR 氨基酸的结构<sup>[2,3]</sup>,与骨密度变化相关。

Fok1 酶切位点多态性影响 VDR 氨基酸的结构主要是由于 VDR 翻译起始区存在两个被 6 个核苷

酸隔开的起始密码子 ATG,当 5'端 ATG 中的 T 突变为 C 时,形成上游起始密码子,此时, VDR 被 3 个氨基酸(F allele)延长,相比之下,由下游位点起始翻译的 3 个氨基酸的 VDR 则较短(F allele)。

VDR 基因的几种多态性以及不同的多态性对 BMD 的影响是近些年来该领域关注的热点。由于 Fok1 多态性是至今发现的惟一影响 VDR 氨基酸结构的多态性位点并与骨密度相关。目前,已有报道少数民族及绝经后女性 Fok1 多态性的研究结果<sup>[4,5]</sup>。本研究对老年男性进行 VDR 基因 Fok1 多态性进行研究,旨在探讨 VDRSC 与老年男性的 BMD 的关系,为骨质疏松(OP)发病机制和遗传因素的相关性研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 对象

基金项目:军队十五课题面上项目(A类)基金资助(01MA118)

作者单位:100853 北京 解放军总医院老年医学研究所(张红红、胡亚卓、牟小芬、吴青、孟秀梅、陶国枢);第二炮兵总医院内分泌科(詹志伟、裴育、崔志辉)

通讯作者:张红红,Email: zhanghhu@hotmail.com

**1.1.1 骨质疏松组** 我院及二炮总医院门诊患者 26 例,平均年龄  $70.5 \pm 5.3$  岁。均无高血压、肾病、糖尿病等内分泌系统疾病病史,无使用糖皮质激素史。

**1.1.2 对照组** 我院体检人员 66 例,平均年龄  $73.4 \pm 4.3$  岁。除外高血压、肾病、糖尿病等内分泌系统疾病病史,并且均未应用过影响骨代谢的药物。

**1.2 研究方法**

**1.2.1 BMD 的测量** 采用美国 Lunar 公司 DPX-L 型双能 X 线吸收仪(DEXA)检测 BMD。每日测定前均进行仪器性能检测,重复测定的变异系数为 1.3%。测定部位为第 2~4 腰椎正位骨密度,准确定位后,进行扫描,由微机自动分析及打印结果。以同性别、同部位峰值 BMD 减低两个标准差为诊断 OP 的标准。

**1.2.2 DNA 的提取** 取全血 2 ml,经典法<sup>[6]</sup>提取基因组 DNA。

**1.2.3 PCR 扩增 VDR 基因** 引物序列为<sup>[3]</sup>:VDR2a: 5'-AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTTTCTCCCTC-3'; VDR2b: 5'-ATGGAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC-3'。PCR 扩增反应体系为 25  $\mu$ l,其中含基因组 DNA 100 ng、10 $\times$  缓冲液 2.5  $\mu$ l、dNTPs 0.2  $\mu$ mol、引物浓度分别为 0.4  $\mu$ mol/L。置热循环仪(Eritom INC)中 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,再加 Taq DNA 酶 2 U。按下列程序循环 30 次,即 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min,60 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,最后于 72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min。取 PCR 产物 5  $\mu$ l 置 2% 琼脂糖电泳,溴化乙锭(EB)染色,紫外灯下观察扩增是否成功。

**1.2.4 扩增产物的限制性酶切** PCR 扩增产物 5  $\mu$ l 直接用 5 U FokI 酶切,反应终止后,酶切产物经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,EB 染色后,用凝胶图像分析系统确定三种基因型,缺乏 FokI 酶切位点的纯合子为 FF 型,显示 265 bp 一条带,存在 FokI 酶切位点的纯合子为 ff 型,显示 196 bp 和 69 bp 两条带,杂合子(Ff)显示上述三条带,见图 1。

**1.2.5 统计学处理** 采用基因计数法分别统计两组样本基因型和等位基因的分布频率。应用 SPSS 10.0 统计软件分析。组间的基因型和等位基因分布频率差异用 pearson  $\chi^2$  检验, $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

**2 结果**

**2.1 PCR 扩增 VDR 基因**

模板 DNA 提取后,经 PCR 扩增,扩增出特异性片段(265 bp)(图 2)。

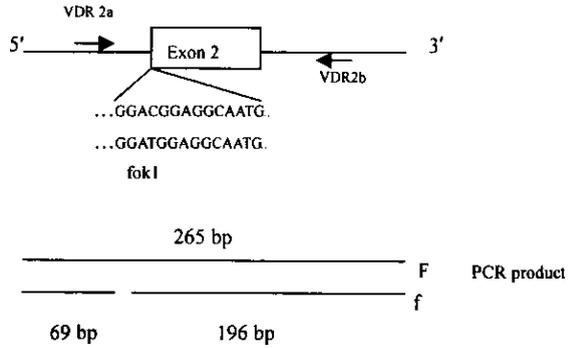
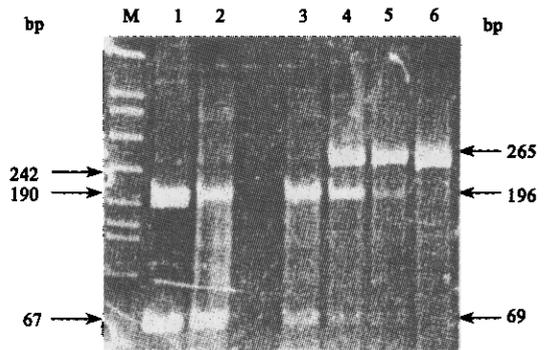


图 1 VDR 基因 fokI 酶切位点

Fig.1 The pattern of VDR gene(FokI) polymorphism



M: HpaII DNA marker; 1,2,3: ff 型; 4,5: Ff 型; 6: FF 型

图 2 VDR 基因 FokI PCR-RFLP 结果

Fig.2 PCR-RFLP results of VDR gene (FokI)

**2.2 PCR-RFLP 法确定 VDR 基因 FokI 多态位点基因型**

共测定 92 例样品,用限制性内切酶 FokI 检出 3 种不同基因型,即 FF(图 2)、Ff(图 2)和 ff(图 2)。

**2.3 VDR 基因 fokI 多态位点基因型和等位基因频率分布** VDR 基因 fokI 多态性分布符合遗传学的 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律,结果见表 1。

表 1 VDR 基因 FokI 多态位点基因型和等位基因频率分布

Table 1 The frequencies distribution of vitamin D receptor genotype and allele(FokI) between two groups

组别 Group	例数 n	基因型频率(%) <sup>*</sup> Genotype			等位基因频率(%) <sup>*</sup> Allele	
		FF	Ff	ff	F	f
对照组 Control	66	42.42 (28)	42.42 (28)	15 (10)	63.63 (84)	36.21 (48)
骨质疏松组 Osteoporosis	26	15.38 (4)	50 (13)	34.62 (9)	40.38 (21)	59.62 (31)

注: \*  $\chi^2 = 12.078, P = 0.002$ ; \*\*  $\chi^2 = 8.232, P = 0.004$

### 3 讨论

欧美和日本研究者报告 VDR 基因 *fok1* 多态位点 *ff* 基因型具有较低的 BMD 值<sup>[3,7]</sup>。Arai 等<sup>[7]</sup>报告日本 24~45 岁未绝经妇女 *ff* 型腰椎 BMD 较 *FF* 型低 12%。Harris 等<sup>[8]</sup>对 20~40 岁未绝经女性进行的研究表明, *ff* 型女性股骨颈 BMD 显著低于 *FF* 型 7.4%。Lucotte 等<sup>[9]</sup>报告法国 45~75 岁绝经妇女 *ff* 型股骨颈 BMD 显著低于 *FF* 型 7.4%。意大利研究者<sup>[10]</sup>发现 45~72 岁绝经女性椎骨骨折患者与无骨折对照的基因频率分布比较, 椎骨骨折患者中 *ff* 型所占比例显著高于对照组, 分别为 25% 和 11%。另外, 有部分研究未能证实 *fok1* 多态性与骨质疏松具有的相关性。

有关老年男性的 VDR 基因 *fok1* 多态性与骨质疏松的相关性研究少有报道。本研究结果显示老年男性骨质疏松组 VDR 基因 *fok1* 多态性 *FF*、*Ff*、*ff* 基因型与对照组比较, 差异有显著性意义 ( $\chi^2 = 12.078, P = 0.002$ ), 其中, *ff* 基因型分别为 34.62% 和 15%。提示就目前调查例数而言, VDR 基因翻译起始位点的 *fok1* 多态性和老年男性 BMD 有一定关联, 这对于我国骨质疏松发病机理及诊治具有重要意义。同时, 这项研究也有待于进一步增加样本等来加以深入。

总之, *Fok1* 酶切位点多态性与骨质疏松相关性的研究, 还涉及到研究对象的种族、生活环境、营养状况、钙摄取、年龄、绝经年限等因素<sup>[11]</sup>。我们得到的初步结果将有助于对我国老年骨质疏松基因与环境、预防策略和治疗措施的深入研究。

(致谢 本课题中 VDR 基因 *Fok1* 多态性的分析技术得到了日本德岛大学医学部武田英二教授及他的实验室的真诚、无私具体的指导。)

### 【 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: 284-287.
- [ 2 ] Miyamoto K, Taketani Y, Arai E, et al. A novel polymorphism in the vitamin D receptor gene and bone mineral density: study of vitamin D receptor expression and function in COS-7 cells. *J Bone Miner Res*, 1996, 11(Suppl 11): S116.
- [ 3 ] Gross C, Eccleshall TR, Malley PJ, et al. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American Women. *J Bone Miner Res*, 1996, 11: 1850-1855.
- [ 4 ] 李继海, 卢华君, 李海林, 等. 阿昌族与汉族维生素 D 受体基因 *Fok1* 多态性. *中华医学遗传学杂志*, 2003, 20(4): 315-317.
- [ 5 ] 章振林, 赵金秀, 孟迅吾, 等. 维生素 D 受体基因起始密码和 3'端多态性与绝经后妇女骨密度的关系. *中华医学遗传学杂志*, 2003, 20(1): 5-8.
- [ 6 ] Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989: 931-958.
- [ 7 ] Arai H, Miyamoto K, Taketani Y, et al. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *J Bone Miner Res*, 1997, 12: 915-921.
- [ 8 ] Harris SS, Eccleshall TR, Gross C, et al. The vitamin D receptor start codon polymorphism (*Fok1*) and bone mineral density in premenopausal American black and white women. *J Bone Miner Res*, 1997, 12(7): 1043-1048.
- [ 9 ] Lucotte G, Mercier G, Burckel A. The vitamin D receptor start codon polymorphism and bone mineral density in osteoporotic postmenopausal French women. *J Clin Genet*, 1999, 56(3): 221-224.
- [ 10 ] Gennari L, Becherini L, Mansani R, et al. *Fok1* polymorphism at translation initiation site of the vitamin D receptor gene predicts bone mineral density and vertebral fractures in postmenopausal Italian women. *J Bone Miner Res*, 1999, 14(8): 1379-1386.
- [ 11 ] 田军, 陶天遵, 王凯夫, 等. 老年男性骨质疏松及雌激素受体的研究进展. *中国骨质疏松杂志*, 2005, 11: 95-97.