文章编号:1000-5404(2008)04-0333-04

论著

绝经后女性雌激素受体 β 基因多态性与骨密度的关系

耿　力,姚珍薇,乐爱文,骆建云,韩力力,卢　起　(重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400016)

摘　要:目的　探讨绝经后女性雌激素受体 β 基因(estrogen receptor β, ESR2)CA 重复序列多态性及 G1082A 多态性与骨密度的关系。**方法**　随机数字表法抽取重庆地区绝经后女性 200 例,采用基因扫描及 DNA 测序技术分析 ESR2 基因 CA 重复序列多态性,采用多聚酶链反应-限制性片段长度多态性法分析 ESR2 基因 G1082A 多态性,使用双能 X 线骨密度仪测量股骨近端及腰椎骨密度。**结果**　以 CA 重复序列平均数 22 次为界,将重复序列基因分为短基因(<22)和长基因(≥22),分别以 S 和 L 表示。200 名绝经后女性中 CA 重复序列基因型 SS、SL 及 LL 的频率分别为 25.0%、46.0% 及 29.0%;G1082A 基因型 rr、Rr 及 RR 的频率分别为 43.0%、42.0% 及 15.0%;基因型频率分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡($P>0.05$)。在校正年龄、绝经年限、身高、体质量和体质指数后,CA 重复序列 SS 基因型者股骨颈骨密度较 SL 或 LL 基因型者高($P<0.01$),其余部位(大转子、Wards 三角和腰椎)各基因型骨密度无统计学差异($P>0.05$);G1082A 位点各基因型股骨颈、大转子、Wards 三角及腰椎骨密度无统计学差异($P>0.05$);这 2 个 ESR2 基因的多态性位点非连锁不平衡($P>0.05$)。**结论**　绝经女性中,ESR2 基因第 5 内含子的 CA 重复序列多态性可能对骨密度的遗传调节起作用,而 ESR2 基因第 5 外显子的 G1082A 多态性可能对骨密度无明显影响。

关键词: 雌激素受体 β 基因;遗传多态性;骨密度;骨质疏松症
中图法分类号: R322.71;R394.1;R711.510.2　　**文献标识码:** A

Association of polymorphism of estrogen receptor β gene with bone mineral density after menopause

GENG Li, YAO Zhen-wei, LE Ai-wen, LUO Jian-yun, HAN Li-li, LU Qi (Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective　To investigate the association of CA repeat polymorphism and G1082A polymorphism of the estrogen receptor β (ESR2) gene with bone mineral density (BMD) in postmenopausal women. Methods　Two hundred postmenopausal women who visited our out-patient clinic were enrolled. The CA repeat polymorphism of ESR2 gene was determined by gene scan and DNA sequence methods. The G1082A polymorphism of ESR2 gene was detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. BMD for the proximal femur and lumbar spine (L_2-L_4) was measured by dual-energy X-ray absorptiometry. Results　The $(CA)_n<22$ and $(CA)_n\geq22$ alleles were designated as S and L, respectively. The frequency of genotypes in 200 postmenopausal women was as follows: SS (25.0%), SL (46.0%), LL (29.0%) for CA repeat polymorphism, and rr (43.0%), Rr (42.0%), RR (15.0%) for G1082A polymorphism. The distribution of genotypes was in Hardy-Weinberg equilibrium. After adjusting for age, menopausal period, height, weight and body mass index, BMD was higher in postmenopausal women with SS genotype than SL or LL genotype for CA repeat polymorphism at femoral neck ($P<0.01$), but there was no significant difference in BMD of trochanter, Wards triangle and lumbar spine for different genotypes ($P>0.05$). In different genotypes for G1082A polymorphism, there was no significant difference in BMD of each skeletal region ($P>0.05$). The ESR2 polymorphism was not in linkage disequilibrium ($P>0.05$). Conclusion　In postmenopausal women, CA repeat polymorphism in the fifth intron of the ESR2 gene may contribute to the genetic regulation of BMD, but the G1082A polymorphism in the fifth exon of the ESR2 gene may not significantly affect BMD.

Key words: estrogen receptor β gene; genetic polymorphism; bone mineral density; osteoporosis

作者简介:耿　力,女,云南省昆明市人,博士研究生,主治医师,主要从事妇科内分泌方面的研究。电话:13018355956,E-mail:gengli007@sina.com
收稿日期:2007-03-07;**修回日期:**2007-07-15

绝经后内分泌、环境及遗传因素对绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMO)的发病均起重要作用[1]。雌激素的缺乏在绝经后女性骨代谢改变过程中起到了极为重要的作用,其效应主要通过雌激素受体(estrogen receptor, ER)发挥。而ER基因(α亚型和β亚型)多态性或突变不仅与某些部位骨骼骨量减少密切相关,还与激素替代治疗对绝经后骨质疏松症的疗效有关。ER基因已成为骨质疏松症的重要候选基因。目前对ER基因β亚型(estrogen receptor β, ESR2)的研究较为稀少。本研究对重庆地区绝经后女性ESR2基因第5内含子的二核苷酸(CA)重复序列多态性及第5外显子的G1082A多态性与骨密度(bone mineral density, BMD)的关系进行探讨。

1 资料与方法

1.1 研究对象

调查本科门诊就诊的256例绝经后女性,随机(采用简单随机抽样之随机数字表法)选择其中200例为研究对象。年龄(51.82±6.15)岁,绝经年龄(47.83±3.33)岁,绝经(4.02±3.18)年。纳入标准:居住重庆地区10年以上,汉族,年龄41~78岁,自然绝经时间≥1年,无服用影响骨代谢药物史、无影响骨代谢的疾病史及无外伤性骨折史。剔除标准:绝经过早(≤40岁),继发性骨质疏松症,其他低骨量的疾病(各种骨软化症,原发性、继发性甲状腺功能亢进等),研究个体间有血缘关系者。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取 抽取EDTA抗凝全血3 ml,常规酚/氯仿法提取白细胞基因组DNA。

1.2.2 ESR2基因CA重复序列多态性的检测 PCR反应:反应的上游引物序列FAM标记:5′-TACCCAGGTGTGTGCTGCG-3′,下游引物序列:5′-CGTGCCTGGCCTAAAGAAGA-3′。PCR反应体系为50 μl,其中模板DNA 100 ng,10×PCR缓冲液5 μl,*Taq* DNA聚合酶2.5 U,10 mmol/L三磷酸脱氧核苷(dNTPs)4 μl,25 mmol/L $MgCl_2$ 3 μl,25 pmol/L上、下游引物各1 μl。PCR反应条件:95 ℃预变性3 min,然后95 ℃ 20 s,57 ℃ 20 s,72 ℃ 30 s,30个循环后,72 ℃延伸5 min。PCR扩增产物长度182 bp。ABI公司377 DNA测序仪上进行PCR产物电泳,GENESCAN和GENETYPE软件分析定型,并对部分纯合子测序鉴定其CA重复次数。

根据国外文献报道,以重复序列平均数22次为界,将重复序列基因分为短基因(<22)和长基因(≥22),分别以S和L表示。两等位基因均为S或均为L或一个等位基因为S而另一个等位基因为L,则基因型分别表示为SS、SL和LL[2]。

1.2.3 ESR2基因G1082A多态性的检测 采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)进行基因型的检测。PCR反应上、下游引物序列分别为:5′-TCTTGCTTTCCCCAGGCTTT-3′、5′-ACCTGTCCAGAACAAGATCT-3′。PCR反应体系为50 μl,其中模板DNA 100 ng,10×PCR缓冲液5 μl,*Taq* DNA聚合酶2.5 U,10 mmol/L dNTPs 4 μl,25 mmol/L $MgCl_2$ 3 μl,25 pmol/L上、下游引物各1 μl。PCR反应条件:95 ℃预变性3 min,然后95 ℃ 20 s,60 ℃ 20 s,72 ℃ 30 s,30个循环后,72 ℃延伸5 min。PCR扩增产物长度为156 bp。PCR产物经限制性内切酶*Rsa* Ⅰ(NEW ENGLAND BioLabs公司产品)37 ℃反应1 h,酶切产物于含EB的2%的琼脂糖凝胶电泳确定基因型。

1.2.4 BMD的测定 美国NORLAND公司XR-46型双能X线骨密度仪(dual-energy X-ray absorptiometer, DEXA)测定200例受试者左股骨近端(包括股骨颈、大转子及Wards三角)及第2~4腰椎(L_2~L_4)前后位(A-P) BMD(g/cm^2)。

1.3 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件,χ^2检验检测ESR2基因CA重复序列及G1082A基因型分布,协方差分析(ANCOVA)比较不同基因型BMD值;采用Arlequin 3.1软件对ESR2基因CA重复序列多态性及G1082A多态性位点进行连锁不平衡分析。

2 结果

2.1 ESR2基因CA重复序列多态性

2.1.1 重庆地区绝经后女性ESR2基因CA重复序列基因型分布 检测到170、172、174、178、180、182、184及186共8种(CA)n等位基因(nt),以重复序列次数来表示则分别为18、19、20、22、23、24、25、26次重复8个等位基因;共检测出170/182、170/184、172/172、172/174、172/180、172/184、172/186、174/180、174/182、174/184、178/180、178/182、178/184、180/182、182/186及184/184共16种基因型。

S和L等位基因频率分别为0.48和0.52,SS、SL和LL基因型频率分别为0.25、0.46和0.29,经χ^2检验,基因型分布符合Hardy-Weinberg平衡($\chi^2=1.233$, $P=0.267$)。

2.1.2 ESR2基因CA重复序列基因型BMD分布 由于年龄、绝经时间、身高、体质量及体质指数等因素与BMD的相关性具有统计学意义($P<0.05$),采用ANCOVA(校正年龄、绝经时间、身高、体质量及体质指数等混杂因素)进行分析。SS基因型者股骨颈BMD较SL或LL基因型者高($P<0.01$),其余部位(大转子、Wards三角和L_2~L_4)各基因型BMD无统计学差异($P>0.05$)。见表1。

表1 200例重庆地区绝经后女性ESR2基因CA重复序列基因型BMD(校正后)分布 (g/cm^2, $\bar{x}\pm s_{\bar{x}}$)

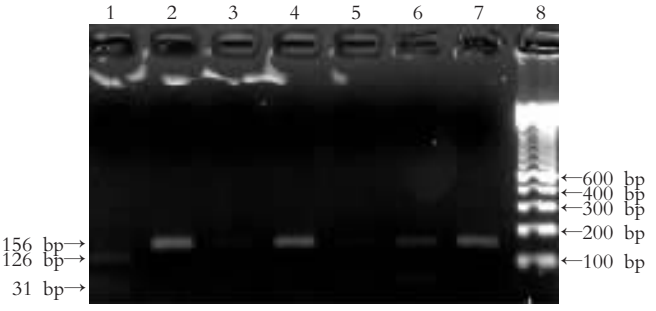
部位	SS型	SL型	LL型	*P*型
股骨颈	0.829±0.022	0.775±0.015[a]	0.729±0.020[a]	0.007
大转子	0.636±0.018	0.617±0.013	0.587±0.017	0.148
Wards三角	0.596±0.024	0.574±0.017	0.544±0.022	0.311
L_2~L_4	0.898±0.028	0.869±0.020	0.863±0.026	0.636

a: $P<0.01$,与SS型比较

2.2 ESR2基因G1082A多态性

2.2.1 ESR2基因G1082A基因型分布 结果中大写字母表示存在点突变,而且出现在该酶切位点;小写字母表示野生型,

不存在该酶切位点。*Rsa* Ⅰ酶切可区分出 3 种基因型:rr 型(终产物为 156 bp 的条带),Rr 型(终产物为 156、125、31 bp 的 3 条条带),RR 型(终产物为 125、31 bp 的 2 条条带),见图 1。



1:RR 基因型;2、4、7:rr 基因型;3、5、6:Rr 基因型;8:标准

图 1　200 例重庆地区绝经后女性 ESR2 基因 G1082A 基因型

重庆地区绝经后女性中发现 rr、Rr 和 RR 基因型,频率分别为 0.430、0.420 和 0.150,r 和 R 等位基因频率分别为 0.640 和 0.360。基因型频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡(χ^2 = 1.568, P = 0.211)。

2.2.2　ESR2 基因 G1082A 基因型 BMD 分布　　采用 ANCOVA(校正年龄、绝经时间、身高、体质量及体质量指数等混杂因素)进行分析:ESR2 基因 G1082A 位点各基因型股骨颈、大转子、Wards 三角及腰椎 BMD 无统计学差异(P > 0.05)。见表 2。

表 2　200 例重庆地区绝经后女性 ESR2 基因 G1082A 基因型 BMD(校正后)分布(g/cm^2, $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

部位	rr 型	Rr 型	RR 型	P
股骨颈	0.779 ± 0.017	0.766 ± 0.017	0.788 ± 0.029	0.776
大转子	0.615 ± 0.014	0.615 ± 0.014	0.598 ± 0.023	0.799
Wards 三角	0.566 ± 0.018	0.574 ± 0.018	0.574 ± 0.031	0.938
$L_2 \sim L_4$	0.868 ± 0.021	0.884 ± 0.021	0.867 ± 0.035	0.852

2.3　ESR2 基因 CA 重复序列多态性位点及 G1082A 多态性位点的连锁不平衡分析

连锁不平衡系数 D′ = 0.069 8,相关系数 r^2 = 0.043 8,χ^2 检验示 ESR2 基因 CA 重复序列多态性位点及 G1082A 多态性位点非连锁不平衡(P > 0.05),见表 3。

表 3　200 例重庆地区绝经后女性 ESR2 基因型的列联表资料分析

ESR2 基因	ESR2 基因 G1082A 基因型		
CA 重复序列基因型	rr 型	Rr 型	RR 型
SS 型	22(21.5)	18(21.0)	10(7.5)
SL 型	36(39.6)	40(38.6)	16(13.8)
LL 型	28(24.9)	26(24.4)	4(8.7)

数字表示观察值(期望值),χ^2 检验基因型分布:χ^2 = 5.017, P = 0.286

3　讨论

雌激素的效应主要通过 ER 发挥,骨骼细胞 ER 的表达与骨量增长和维系有着密切关系。ERα(ESR1)和 ERβ(ESR2)两种受体的亚型在功能区域上存在着高度同源性,但随着骨龄增长和成骨细胞分化,两者表达水平呈不同的变化趋势[3]。且两者受雌激素的不同调节而激活转录不同的骨相关基因[4]。ESR2 在介导雌激素调节骨代谢的过程中与 ESR1 存在差异但又相互关联:ESR1 存在情况下,ESR2 可削弱前者的激活转录功能;而当 ESR1 丧失的情况下,ESR2 却可部分替代其功能,两者之间可能存在着“阴阳”互补的关系[5,6]。ESR1 基因多态性在骨代谢中的作用已有大量的研究,然而关于 ESR2 基因多态性对骨代谢的影响研究较少。ESR2 基因位于 14q23-24.1,包含 8 个外显子,全长 40 kb[7]。ESR2 在成骨细胞、破骨细胞及骨髓间质细胞均有表达[3]。已发现人 ESR2 基因的 9 个多态性位点,除位于第 5 内含子的 CA 重复序列多态性,尚有 T1421C、G1082A、A1730G、C143T、A566T、T1100G、A105G 及 T1057G 共 8 个多态性位点,但这些多态性位点的作用未能阐明[1]。

本研究中各基因型股骨颈 BMD 差异有统计学意义(P = 0.007)。SS 基因型者股骨颈 BMD 较 SL 或 LL 基因型者高(P < 0.01),大转子、Wards 三角和 $L_2 \sim L_4$ 部位各基因型 BMD 无统计学差异(P > 0.05),这显示了 ESR2 基因 CA 重复序列多态性与绝经后女性 BMD 有一定关联,其中 SS 型对绝经后女性股骨颈 BMD 具有一定的保护作用。Scariano 等[8]对美国新墨西哥州绝经后女性的研究显示:短基因(<25)者全身骨骼、腰椎及股骨颈 BMD 较长基因(≥25)者高,且前者有较高循环雌激素水平,但 ESR2 基因 CA 重复序列多态性与 BMD 及骨代谢血清生化标志水平的纵向变化并无相关性。Framingham 研究报道两性短基因(<23)者股骨颈 BMD 较长基因(≥23)者高,最低 BMD 出现于长基因的纯合子[9]。尽管由于人种和种族不同所检测到的 CA 重复序列次数变化范围存在差异,并由于这种差异导致重复序列平均数差异,本研究为 22,而 Scariano 和 Framingham 的研究一为 25,一为 23,同时样本量大小、研究对象年龄、纳入标准及统计学分析方法也存在差异,但本研究结果与 Scariano 和 Framingham 的研究结果一样显示了短基因型者某些部位 BMD 较长基因型者高。

G1082A 多态性是位于 ESR2 基因第 5 外显子配体结合区的一个沉默突变,不能导致氨基酸的变换。重庆地区绝经后女性中检测到 G1082A 多态性 rr、Rr 及 RR 3 种基因型,频率分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律(P > 0.05),且各部位各基因型 BMD 无统计学差异(P > 0.05),这提示 G1082A 多态性与 BMD 并

无明显关联。这一研究结果与国外报道一致[10,11]。

目前缺乏这2个多态性位点对功能的影响,若要验证基因多态性是否影响ESR2基因表达,要用不同基因型的ESR2基因构建质粒,再转染细胞,检测ESR2基因活性和蛋白产量。研究发现ESR2基因CA重复序列多态性位点与G1082A多态性位点非不平衡连锁,这仅能说明ESR2基因CA重复序列多态性较G1082A多态性与绝经后女性BMD的关系更为密切。

综上所述,绝经后女性中,ESR2基因第5内含子的CA重复序列多态性可能对BMD的遗传调节起作用,而位于ESR2基因第5外显子的G1082A多态性可能对BMD无明显影响。

参考文献:

[1] Gennari L, Merlotti D, De-Paola V, *et al*. Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: a HuGE review[J]. Am J Epidemiol, 2005, 161(4): 307-320.

[2] Westberg L, Baghaei F, Rosmond R, *et al*. Polymorphisms of the androgen receptor gene and the estrogen receptor beta gene are associated with androgen levels in women[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(6): 2562-2568.

[3] Batra G S, Hainey L, Freemont A J, *et al*. Evidence for cell-specific changes with age in expression of oestrogen receptor (ER) alpha and beta in bone fractures from men and women[J]. J Pathol, 2003, 200(1): 65-73.

[4] Kian-Tee M, Rogatsky I, Tzagarakis-Foster C, *et al*. Estradiol and selective estrogen receptor modulators differentially regulate target genes with estrogen receptors alpha and beta[J]. Mol Biol Cell, 2004, 15(3): 1262-1272.

[5] Lindberg M K, Moverare S, Skrtic S, *et al*. Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ERalpha and ERbeta in mice[J]. Mol Endocrinol, 2003, 17(2): 203-208.

[6] Chagin A S, Lindberg M K, Andersson N, *et al*. Estrogen receptor-beta inhibits skeletal growth and has the capacity to mediate growth plate fusion in female mice[J]. J Bone Miner Res, 2004, 19(1): 72-77.

[7] Deroo B J, Korach K S. Estrogen receptors and human disease[J]. J Clin Invest, 2006, 116(3): 561-570.

[8] Scariano J K, Simplicio S G, Montoya G D, *et al*. Estrogen receptor beta dinucleotide (CA) repeat polymorphism is significantly associated with bone mineral density in postmenopausal women[J]. Calcif Tissue Int, 2004, 74(6): 501-508.

[9] Shearman A M, Karasik D, Gruenthal K M, *et al*. Estrogen receptor beta polymorphisms are associated with bone mass in women and men: The Framingham Study[J]. J Bone Miner Res, 2004, 19(5): 773-781.

[10] Ichikawa S, Koller D L, Peacock M, *et al*. Polymorphisms in the estrogen receptor beta (ESR2) gene are associated with bone mineral density in Caucasian men and women[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(11): 5921-5927.

[11] Efstathiadou Z, Koukoulis G, Stakias N, *et al*. Correlation of estrogen receptor beta gene polymorphisms with spinal bone mineral density in peri- and post-menopausal Greek women[J]. Maturitas, 2006, 53(4): 380-385.

(编辑 薛国文)

(上接332页)

并关心体贴患者,及时给予安慰、鼓励和解释,讲解有关病情和治疗方法,并与经管医师联系尽量使用价格低廉且能达到治疗效果的药物,以使患者解除思想顾虑,稳定情绪,主动配合治疗和护理;协助医师做好检查工作,如及时做异物定位检查、眼B超检查,以明确诊断和选择手术时机;做好术前常规检查及准备,如做好血、尿、大便常规检查,完成胸透、心电图等检查,以排除手术禁忌证;抗生素眼液点眼每日4次,术前剪睫毛、冲洗泪道及结膜囊、消毒眼眶局部皮肤。

2.2 术后护理

术后加强病情观察,做好对症处理。注意局部疼痛的性质及程度,有无渗血,如伤口疼痛者适当给予镇静止痛剂。单纯异物取出或术中出现玻璃体出血患者术后行半卧位休息,以利于眼内血液吸收。行惰性气体(C_3F_8)及硅油填充术者,术后应俯卧位休息。为减少患者俯卧位时的不适,使用我科自制的U字形软枕来减少患者特殊体位的不适度,同时给予患者受压部位皮肤适当的按摩,促进局部血液循环,并反复向患者强调体位对手术成功的重要性,使患者积极配合[3]。当患者眼内充填入膨胀惰性气体(C_3F_8)膨胀时,若因眼压增高引起疼痛,应及时向医师反映,立即按医嘱给予降眼压处理。为了保护术眼,应告之患者不能用力揉眼及碰触术眼,动作轻柔、不能过度摇晃头部,避免再次视网膜脱离。另外,长时间被动体位导致患者活动受限,胃肠蠕动减弱,术后患者应进食清淡易消化且营养丰富的食物,多进食水果、蔬菜,保持大变通畅,避免咀嚼坚硬食物防止伤口裂开。嘱咐患者注意保护术眼,避免再次外伤,保持术眼清洁、干燥,勿用不洁手或纸巾等揉眼。必须向患者强调复查时间,了解视网膜情况,若有不适立即就诊。

关键词: 复杂眼内异物;联合玻璃体切割手术;护理
中图法分类号: R473.77 **文献标识码:** B

参考文献:

[1] 徐景美, 徐 冰, 李秀娟. 玻璃体切除术治疗复杂眼内异物[J]. 眼外伤职业眼病杂志, 2003, 25(4):267.

[2] 谢汉平, 王 一, 陈少军, 等. 临时人工角膜下穿透性角膜移植联合玻璃体切除手术治疗眼球前、后节外伤的远期疗效[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(21): 2195-2197.

[3] 黄朝晖, 赖小玲, 陈惠媛. 充气性视网膜固定术的体位护理42例[J]. 实用护理杂志, 2003, 19(8): 38.

(编辑 吴培红)