文章编号:1000-5404(2010)01-0081-04

论著

雌激素受体2基因多态性与绝经后女性骨密度的相关性研究

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

[摘要] **目的** 探讨雌激素受体2(estrogen receptor beta, ESR2)基因的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism,SNP)与绝经后女性的骨密度(bone mineral density,BMD)是否相关。**方法** 使用双能X线骨密度仪测量重庆市140例绝经后女性第2~4腰椎(L_2~L_4)及左股骨颈BMD值。采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术分析ESR2基因第5外显子T1057G和G1082A及第8外显子G1730A SNPs。**结果** 在全部受试者中,ESR2基因第5外显子1057T位点仅检测到VV 1种基因型;G1082A基因型RR、Rr及rr频率分别为81.43%、17.14%及1.43%;G1730A基因型AA及Aa频率分别为87.86%及12.14%,aa基因型缺失;G1082A和G1730A SNPs的基因型分布符合Hardy-Weinberg平衡($P>0.05$)。校正年龄、体质量、绝经年限等BMD影响因素后,G1082A SNP与L_2和L_4BMD显著相关($P<0.05$),而与L_3及股骨颈BMD无明显关联($P>0.05$);G1730A SNP与股骨颈BMD显著相关($P<0.01$),而与腰椎BMD无明显关联($P>0.05$)。**结论** 绝经后女性ESR2基因第5外显子G1082A SNP的r等位基因可能是腰椎低BMD的独立危险因素;第8外显子G1730A SNP的a等位基因可能是股骨颈低BMD的独立危险因素。

[关键词] 雌激素受体2基因;单核苷酸多态性;骨密度;聚合酶链反应-限制性片段长度多态性
[中图法分类号] R322.71;R394.1;R711.510.2 **[文献标志码]** A

Estrogen receptor beta gene polymorphisms is correlated with bone mineral density in postmenopausal women

Ou Wenjun, Yao Zhenwei, Luo Jianyun, Han Lili, Lu Qi (Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To investigate whether single nucleotide polymorphisms (SNPs) of estrogen receptor beta (ESR2) gene were correlated with bone mineral density (BMD) in postmenopausal Chinese women. **Methods** Totally 140 postmenopausal women at the age of (54.58±5.85) who living in Chongqing for at least 10 years received BMD measuring in our department from March to October 2007. BMD was measured at the lumbar spine (L_2 to L_4) and left hip (including the femoral neck, trochanter and Ward's triangle) by dual energy X-ray absorptiometry. Three SNPs of ESR2 gene, including the T1057G and G1082A SNPs in the fifth exon and G1730A SNP in the eighth exon, were detected by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). **Results** In all subjects, only VV genotype was detected for the 1057T locus in the fifth exon. The distribution of G1082A genotypes was RR (81.43%), Rr(17.14%) and rr (1.43%). And of G1730A the genotypes were AA (87.86%) and Aa (12.14%), while the genotype aa was absent. The distribution of G1082A and G1730A genotypes was in Hardy-Weinberg equilibrium ($P>0.05$). After adjusting for age, weight, menopausal period and other influential factors for BMD, G1082A SNP was significantly associated with L_2 and L_4 BMD ($P<0.05$), but not associated with L_3 and femoral neck BMD ($P>0.05$). G1730A SNP was significantly associated with the femoral neck BMD ($P<0.01$), but not associated with the lumbar spine BMD ($P>0.05$). **Conclusion** In postmenopausal women, r allele of G1082A SNP in the fifth exon of the ESR2 gene may be an independent risk factor of lower spine BMD, while a allele of G1730A SNP in the eighth exon may be an independent risk factor of lower femoral neck BMD.

[Key words] estrogen receptor beta gene; single nucleotide polymorphism; bone mineral density; PCR-RFLP

Corresponding author: Yao Zhenwei, Tel: 86-23-89012620, E-mail: a68892986@yeah.net

绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMO)严重影响中老年女性的健康和生活质量,其发病与雌激素分泌减少密切相关。雌激素需与雌激素受体(estrogen receptor, ER)结合方能发挥其骨骼效应,人类ER包括雌激素受体1(ESR1)和雌激素受体2(ESR2)2种亚型[1]。ESR2基因作为PMO的候选基

[通信作者] 姚珍薇,电话:(023)89012620,E-mail:a68892986@yeah.net

因之一,其遗传多态性可能影响雌激素对骨骼系统的生物学作用,与女性骨密度(bone mineral density, BMD)存在一定关联[2-9]。国外学者已证明 ESR2 基因的 T1057G、G1082A 和 G1730A 位点均存在单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)[10,11],我们在重庆女性中初步研究这 3 个 SNPs 的分布情况,并探讨其与绝经后女性的腰椎及髋部 BMD 的相关性。

1 对象与方法

1.1 研究对象

采用志愿者抽样法,从 2007 年 3 - 10 月在本科骨密度室就诊者中选取 140 例符合以下纳入、排除标准的绝经后女性作为研究对象。纳入标准:汉族,长期居住重庆市(≥10 年),年龄 41 ~ 69 岁,自然绝经年限≥1 年。排除标准:患有或曾患影响骨代谢的疾病(如甲状腺或甲状旁腺功能亢进、卵巢早衰及其他原因所致 40 岁前绝经、慢性肝肾疾病、糖尿病、类风湿性关节炎等),曾长期服用影响骨代谢的药物(如糖皮质激素类药物、雌孕激素、口服避孕药、抗癫痫药等),研究对象间有血缘关系者。本研究得到重庆医科大学伦理委员会批准,受试者对研究内容均知情同意,并填写由我们自行设计的《女性骨质疏松影响因素调查问卷》,其年龄为(54.58 ± 5.85)岁。

1.2 方法

1.2.1 BMD 测定 称量并记录 140 例女性的体质量,采用双能 X 线骨密度仪(美国 Norland 公司,XR-46 型)测量其左股骨颈及第 2 ~ 4 腰椎($L_2 \sim L_4$)前后位 BMD(g/cm^2);骨密度仪每周测 1 次腰椎体模,符合质控要求方可用于受试者,其长期变异系数为 0.32% ~ 0.45%,批内误差 < 1%。

1.2.2 ESR2 基因的 SNPs 分析 抽取外周静脉血 3 ml,0.5 mol/L EDTA 抗凝,提取人类基因组 DNA(美国 Promega 公司,Wizard® 基因组 DNA 纯化试剂盒)置 -20 ℃冻存。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。参照文献[10,11]设计 3 对上、下游引物分别针对 T1057G、G1082A 和 G1730A 多态性的 PCR 反应:上游 5′-GTTGCGCAGCTTAACTTCAAAGTTTTCTTC-3′,下游 5′-TGAAGGAGCTGATGATGCTATC-3′;上游 5′-TCTTGCTTTCCCCAGGCTTT-3′,下游 5′-ACCTGTCCAGAACAAGATCT-3′;上游 5′-TTTTTGTCCCCATAGTAACA-3′,下游 5′-AATGAGGGACCACACAG-3′。PCR 反应体系均为 25 μl,其中模板 DNA 0.1 μg,10 × PCR 缓冲液(不含 Mg^{2+})2.5 μl,*Taq* DNA 聚合酶 0.625 U,dNTPs(各 2.5 mmol/L)2 μl,$MgCl_2$(25 mmol/L)1.5 μl,上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μl。PCR 反应条件均为:首先 95 ℃预变性 4 min;然后 95 ℃变性 30 s、55 ℃退火 50 s、72 ℃延伸 45 s,共 35 个循环;最后 72 ℃终末延伸 10 min。T1057G、G1082A 和 G1730A 位点对应的 PCR 扩增产物长度分别为 456、156、307 bp。PCR 产物分别经限制性内切酶 Van91 Ⅰ、*Rsa* Ⅰ或 *Alu* Ⅰ(均为大连宝生物工程有限公司产品)于 37 ℃反应 1 h,酶切产物于含 Goldview 的 2% 琼脂糖凝胶电泳确定基因型。

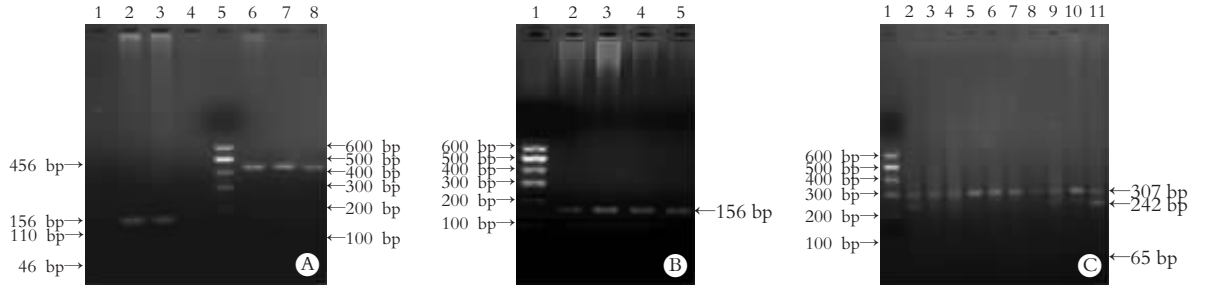
1.3 统计学处理

使用 SAS 8.2 统计软件,采用 χ^2 检验分析各基因型分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡;按是否携带 G1082A SNP 的 r 等位基因将研究对象分为 RR 基因型者和 Rr&rr 基因型者 2 组,采用 *t* 检验分析 $L_2 \sim L_4$ 及股骨颈 BMD 在 2 组间是否存在统计学差异;采用 *t* 检验分析上述 BMD 在 G1730A SNP 的 AA 与 Aa 基因型间是否存在统计学差异;采用逐步多元线性回归模型分别校正各 BMD 的混杂因素后,分析 ESR2 SNPs 基因型是否与上述 BMD 存在关联,纳入该线性回归模型的自变量包括:年龄、体质量、初潮年龄、绝经年限、产次、烟草接触史、饮酒情况、奶类摄入量、豆类摄入量、动物蛋白摄入量、日照时间、体育锻炼频率、补钙情况、G1082A 基因型(分为 RR 型和 Rr&rr 型 2 组)及 G1730A 基因型等。

2 结果

2.1 ESR2 基因的 RFLP 结果

ESR2 基因 Van91 Ⅰ、*Rsa* Ⅰ、*Alu* Ⅰ酶切的 RFLP 结果分别用 v 或 V、r 或 R、a 或 A 表示,其中小写字母表示存在 SNP 而出现相应酶切位点的等位基因,大写字母表示酶切位点缺失的野生型等位基因。Van91 Ⅰ酶切仅见 VV 1 种基因型(电泳产物为 456 bp 单一条带),Vv 和 vv 基因型均缺失;Rsa Ⅰ酶切可区分出 3 种基因型:RR 型(电泳产物为 156 bp 单一条带)、Rr 型(电泳产物为 156、110、46 bp 3 条带)、rr 型(电泳产物为 110、46 bp 2 条条带);*Alu* Ⅰ酶切可见 2 种基因型:AA 型(电泳产物为 307 bp 单一条带)、Aa 型(电泳产物为 307、242、65 bp 3 条条带)、aa 型缺失。见图 1。



A:T1057G 基因型 VV 和 G1082A 基因型 Rr&rr 1:空白对照;2、3:Rr 基因型;4:rr 基因型;5:DNA 标准;6 - 8:VV 基因型;B:G1082A 基因型 RR 1:DNA 标准;2 - 5:RR 基因型;C:G1730A 基因型 1:DNA 标准;2 - 4,9 - 11:Aa 基因型;5 - 8:AA 基因型

图 1 140 例重庆市绝经后女性 ESR2 基因的 RFLP 结果

重庆地区绝经后女性中RR、Rr和rr基因型频率分别为81.43%、17.14%和1.43%，R和r等位基因频率分别为90%和10%，基因型频率分布符合Hardy-Weinberg平衡（$\chi^2=0.355$，$P=0.838$）；AA和Aa基因型频率分别为87.86%和12.14%，A和a等位基因频率分别为93.93%和6.07%，基因型频率分布符合Hardy-Weinberg平衡（$\chi^2=1.030$，$P=0.597$）。

2.2 ESR2基因SNPs与BMD的相关性

2.2.1 G1082A SNP不同基因型之间BMD的对比 2组间L_2～L_4 BMD及股骨颈BMD均无统计学差异（$P>0.05$）。见表1。

表1 G1082A SNP不同基因型之间各部位BMD的对比（g/cm^2，$\bar{x}\pm s$）

基因型	n	L_2	L_3	L_4	股骨颈
RR	114	0.868±0.156	0.896±0.166	0.873±0.142	0.764±0.132
Rr&rr	26	0.805±0.124	0.832±0.125	0.822±0.119	0.741±0.087

2.2.2 G1730A SNP不同基因型之间BMD的对比 Aa基因型者股骨颈BMD明显低于AA基因型者（$t=2.37$，$P=0.019$），2组间L_2～L_4 BMD无统计学差异（$P>0.05$）。见表2。

表2 G1730A SNP不同基因型之间各部位BMD的对比（g/cm^2，$\bar{x}\pm s$）

基因型	n	L_2	L_3	L_4	股骨颈
AA	123	0.858±0.158	0.886±0.167	0.868±0.144	0.769±0.121
Aa	17	0.841±0.111	0.871±0.113	0.832±0.101	0.694±0.135[a]

a：$P<0.05$，与AA比较

2.2.3 校正后ESR2 SNPs与各部位BMD的相关性 L_2～L_4及股骨颈BMD与年龄呈负相关（$P<0.05$），而与体质量呈正相关（$P<0.01$）；L_2、L_3及股骨颈BMD与绝经年限呈负相关（$P<0.05$）；L_2、L_3 BMD与奶类摄入量呈正相关（$P<0.01$）；L_3、L_4 BMD与体育锻炼频率呈负相关（$P<0.05$）；L_4、股骨颈BMD与豆类摄入量呈正相关（$P<0.01$）；此外，L_2、L_3 BMD的影响因素还包括月经初潮年龄、补钙情况、烟草接触史等（$P<0.05$）。排除上述混杂因素的干扰后，G1082A SNP的Rr&rr基因型者L_2和L_4 BMD均显著低于RR基因型者（$P<0.05$），G1730A SNP的Aa基因型者股骨颈BMD显著低于AA基因型者（$P=0.002$），提示ESR2基因G1082A SNP与L_2、L_4 BMD独立相关，G1730A SNP与股骨颈BMD独立相关。见表3～6。

表3 多元线性回归分析L_2 BMD的影响因素

影响因素	标准化回归系数	标准误	F值	P值
年龄	−0.312	0.003	9.14	0.003
体质量	0.297	0.001	19.91	<0.01
初潮年龄	−0.149	0.006	4.96	0.028
绝经年限	−0.315	0.003	10.47	0.002
奶类摄入量	0.223	0.010	10.68	0.001
补钙情况	−0.169	0.021	6.46	0.012
G1082A SNP	−0.180	0.023	7.61	0.007

表4 多元线性回归分析L_3 BMD的影响因素

影响因素	标准化回归系数	标准误	F值	P值
年龄	−0.249	0.003	5.52	0.020
体质量	0.258	0.002	13.72	<0.01
绝经年限	−0.310	0.003	9.53	0.003
烟草接触史	0.157	0.028	5.29	0.023
奶类摄入量	0.192	0.011	7.70	0.006
锻炼频率	−0.147	0.021	4.85	0.029

表5 多元线性回归分析L_4 BMD的影响因素

影响因素	标准化回归系数	标准误	F值	P值
年龄	−0.395	0.002	32.56	<0.01
体质量	0.368	0.001	27.73	<0.01
豆类摄入量	0.207	0.014	9.20	0.003
锻炼频率	−0.227	0.019	10.84	0.001
G1082A SNP	−0.163	0.021	5.72	0.018

表6 多元线性回归分析股骨颈BMD的影响因素

影响因素	标准化回归系数	标准误	F值	P值
年龄	−0.297	0.002	9.02	0.003
体质量	0.287	0.001	18.07	<0.01
绝经年限	−0.223	0.003	5.01	0.027
豆类摄入量	0.252	0.013	14.34	<0.01
G1730A基因型	−0.216	0.025	10.46	0.002

3 讨论

ESR2广泛表达于人成骨细胞、破骨细胞及骨髓间质细胞，对骨骼的生长及调节发挥着必不可少的作用，因此ESR2基因被认为是原发性骨质疏松症的重要候选基因。ESR2在松质骨中广泛存在且表达水平高于ESR1[4]，而PMO正是以松质骨丢失为主要表现，由此推测ESR2基因的多态性可能与绝经后女性的BMD存在一定相关性。SNP可能引起基因在转录、翻译水平失调，从而导致基因表达、功能异常[12]。人ESR2基因常见SNPs包括第5外显子G1082A和第8外显子3′非编码区G1730A多态性。关于G1082A多态性与BMD关系的研究较少，且多项研究结果都提示该SNP与绝经后女性腰椎及髋部BMD无明显相关性[13,14]。其中，希腊学者的研究[14]尚提示G1730A多态性与绝经后女性腰椎及髋部BMD不相关。

本研究单独分析ESR2 SNPs与各部位BMD的相关性，仅发现G1730A SNP与股骨颈BMD显著相关。综合分析环境因素与遗传因素的共同作用发现，年龄较大和体质量较小分别为L_2～L_4及股骨颈BMD较小的危险因素；绝经年限较长为L_2、L_3及股骨颈BMD较小的危险因素；奶类摄入不足为L_2、L_3 BMD较小的危险因素，豆类摄入不足为L_4、股骨颈BMD较小的危险因素，而过度锻炼为L_3、L_4 BMD较小的危险因素。上述影响因素部分掩盖了ESR2基因SNPs与绝经后女性BMD之间的实际关联，造成t检验中出现了一些假阴性结果，校正这些混杂因素后，ESR2基因G1082A SNP的Rr&rr基因型者L_2和L_4BMD明显低于RR基因型者，G1730A SNP的Aa基因型者股骨颈BMD明显低于AA基因型者。据此我们推测，ESR2基因

G1082A SNP出现r等位基因是绝经后女性腰椎低BMD的独立危险因素,G1730A SNP出现a等位基因是其股骨颈低BMD的独立危险因素。

虽然G1082A和G1730A SNPs均为不引起ESR2蛋白氨基酸改变的沉默变异,但它们可能与其他影响基因表达或功能的变异位点存在连锁不平衡,从而通过其他变异位点导致基因表达改变;且不同SNPs能引起mRNA折叠结构的细微改变,可能导致mRNA在合成、剪接、成熟、转运、翻译、降解等方面发生变化[15],从而影响mRNA稳定性及翻译活性[16,17];此外,这些沉默多态性还可能与转录因子等不同分子发生相互作用,从而控制转录活性并影响蛋白质功能。

Zhao等[10]对非洲人的研究发现,位于ESR2基因第5外显子的T1057G SNP可使ESR2蛋白第320位氨基酸由缬氨酸变为甘氨酸,且变异型ESR2的最大转录活性较野生型显著下降。国人中少见关于该SNP的报道,本研究在140例绝经后女性中未检测到该SNP,提示中国人ESR2基因中是否存在上述T1057G SNP尚有待进一步验证。

我们对ESR2基因多态性与BMD相关性的研究结论与国内外其他研究的差异可能归咎于以下原因:①研究的ESR2基因多态位点不相同。②研究人群的种族、性别等遗传背景和环境影响及其二者的相互作用不相同导致了同一多态位点的研究结论不同。③ESR2基因对皮质骨和松质骨的作用可能不相同,因此所研究的骨骼部位不同也会影响结论。④采用不同的统计学方法分也会影响实验结果。我们对重庆地区汉族绝经后女性的研究显示,ESR2基因G1082A、G1730A SNPs均对女性BMD的遗传调节发挥作用,相应的r、a等位基因可能成为临床上预测女性绝经后低BMD的遗传标志物。这一结论尚需多中心、大样本的前瞻性研究进一步验证。

参考文献:

[1] Matthews J, Gustafsson J A. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta[J]. Mol Interv, 2003, 3(5): 281-292.

[2] 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.

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

[4] Lau HH, Ho A Y, Luk K D, *et al*. Estrogen receptor beta gene polymorphisms are associated with higher bone mineral density in premenopausal, but not postmenopausal southern Chinese women[J]. Bone, 2002, 31(2): 276-281.

[5] Valero C, Zarrabeitia M T, Hernandez J L, *et al*. Bone mass in young adults: relationship with gender, weight, and genetic factors[J]. J Intern Med, 2005, 258(6): 554-562.

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

[7] Silvestri S, Thomsen A B, Gozzini A, *et al*. Estrogen receptor alpha and beta polymorphisms: is there an association with bone mineral density, plasma lipids, and response to postmenopausal hormone therapy?[J]. Menopause, 2006, 13(3): 451-461.

[8] Lau H H, Ng M Y, Cheung W M, *et al*. Assessment of linkage and association of 13 genetic loci with bone mineral density[J]. J Bone Miner Metab, 2006, 24(3): 226-234.

[9] Kung A W, Lai B M, Ng M Y, *et al*. T-1213C polymorphism of estrogen receptor beta is associated with low bone mineral density and osteoporotic fractures[J]. Bone, 2006, 39: 1097-1106.

[10] Zhao C, Xu L, Otsuki M, *et al*. Identification of a functional variant of estrogen receptor beta in an African population[J]. Carcinogenesis, 2004, 25(11): 2067-2073.

[11] Sundarrajan C, Liao W X, Roy A C, *et al*. Association between estrogen receptor-beta gene polymorphisms and ovulatory dysfunctions in patients with menstrual disorders[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(1): 135-139.

[12] Nilsson M, Naessen S, Dahlman I, *et al*. Association of estrogen receptor beta gene polymorphisms with bulimic disease in women[J]. Mol Psychiatry, 2004, 9(1): 28-34.

[13] 耿力, 姚珍薇, 乐爱文, 等. 绝经后女性雌激素受体β基因多态性与骨密度的关系[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(4): 333-336.

[14] 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.

[15] Aschim E L, Giwercman A, Stahl O, *et al*. The RsaⅠ polymorphism in the estrogen receptor-beta gene is associated with male infertility[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(9): 5343-5348.

[16] Almeida S, Franken N, Zandona M R, *et al*. Estrogen receptor 2 and progesterone receptor gene polymorphisms and lipid levels in women with different hormonal status[J]. Pharmacogenomics J, 2005, 5(1): 30-34.

[17] Duan J, Wainwright M S, Comeron J M, *et al*. Synonymous mutation in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor[J]. Hum Mol Genet, 2003, 12(3): 205-216.

(**收稿**:2009-06-03;**修回**:2009-07-02)

(编辑 龙 亮)