

MTHFR 基因多态性与苏州地区绝经后妇女骨质疏松易感性的相关性分析

宁魏青¹, 夏静¹, 吴洁^{1*}, 沈彩娥², 殷华芬³

(¹ 南京医科大学第一附属医院妇女保健科, 江苏 南京 210029; ² 苏州市母子医疗保健中心, 江苏 苏州 215002; ³ 苏州市吴中区妇幼保健所, 江苏 苏州 215128)

[摘要] 目的: 研究苏州地区绝经后妇女骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 发生情况, 探讨亚甲基四氢叶酸还原酶 (methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR) 的两个多态性位点 677C>T 和 1298A>C 与苏州地区绝经后妇女骨质疏松遗传易感性的关系。方法: 从苏州市城区随机抽取 45~70 岁的绝经后妇女 261 例, 收集所有研究对象的身高、体重、腰围、臀围等一般资料, 用骨定量超声分析仪测定桡骨远端骨密度, 利用荧光定量 PCR 技术 (TaqMan) 进行基因分型, 对骨质疏松组和对照组 (骨量减少和骨量正常) 的 MTHFR 677C>T 和 1298A>C 两个多态性位点与绝经后骨质疏松易感性的关系进行研究。应用 STATA 11.0 统计软件进行数据的统计分析。结果: 261 例中, 骨质疏松 92 例 (35.25%), 骨量减少 117 例 (44.83%), 骨量正常 52 例 (19.92%)。骨质疏松组 MTHFR 677 位点的 T 等位基因频率 (43.48%) 比对照组 (34.02%) 明显增高 ($P = 0.039$), MTHFR 677 位点的 T/T 纯合突变型可显著增加绝经后骨质疏松的发病风险 (调整 OR=2.37; 95%CI=1.15~4.87), 该作用在年龄 ≤ 60 岁和中心性肥胖 (腰臀比 ≥ 0.80) 的女性中更为明显。MTHFR 1298A>C 的多态性位点对绝经后骨质疏松的发生没有显著影响 ($P = 0.787$)。结论: MTHFR 677C>T 基因变异与苏州地区绝经后妇女骨质疏松易感性明显相关。

[关键词] 骨质疏松; MTHFR; 多态性; 绝经

[中图分类号] R711.75

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)08-1070-05

Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism with osteoporosis in Suzhou postmenopausal women

NING Wei-qing¹, XIA Jing¹, WU Jie^{1*}, SHEN Cai-e², YIN Hua-fen³

(¹ Department of Obstetrics & Gynecology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ² Maternal and Child Health Institute of Suzhou, Suzhou 215002; ³ Maternal and Child Health Institute of Suzhou Wuzhong District, Suzhou 215128, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the prevalence of the postmenopausal women with osteoporosis in Suzhou urban area and evaluate the relationship between MTHFR gene (677C>T and 1298A>C) polymorphisms and the susceptibility to osteoporosis in postmenopausal Suzhou women. **Methods:** A population-based case-control study was conducted, including 261 postmenopausal women aged from 45 to 70 years enrolled through randomized cluster sampling in the community of Suzhou city. The research subject registered their basic information such as height, weight, waist circumference, hip circumference. Bone mineral density was measured by radius quantitative ultrasound. The polymorphisms of MTHFR genes were detected using the TaqMan real-time polymerase chain reaction (PCR) method. **Results:** Compared with the control group (34.02%), the frequency of the MTHFR 677T allele was significantly increased in osteoporosis group (43.48%), $P = 0.039$. Concerning the incidence of postmenopausal osteoporosis, the TT genotype had more than twice of the risk of the CC and CT genotype (OR=2.37, 95%CI=1.15~4.87), especially in women aged ≤ 60 years and central obesity (waist to hip ratio ≥ 0.80). No association was observed between the MTHFR 1298A>C polymorphism and postmenopausal osteoporosis ($P = 0.787$). **Conclusion:** The MTHFR 677C>T polymorphism may contribute to the susceptibility of osteoporosis in postmenopausal women in Suzhou city.

[Key words] osteoporosis; MTHFR; polymorphism; menopause

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(8): 1070-1074]

[基金项目] 江苏省卫生厅面上项目(H200910)

*通讯作者, E-mail: jie.wuyale@gmail.com

近年来遗传因素对骨质疏松(osteoporosis, OP)及骨质疏松性骨折发病的影响逐步受到重视。亚甲基四氢叶酸还原酶(methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)基因是影响骨质疏松及骨质疏松性骨折发病的重要候选基因之一,它是叶酸代谢通路上参与 DNA 正常合成和甲基化的重要基因之一。1994 年, Goyette 测序得出 MTHFR 基因, 与猪 MTHFR、酵母菌 metF 基因、大肠杆菌 metF 基因有相当高的同源性, 在生物群体中是一个原始的、保守的、有重要功能的基因, 在该基因保守氨基酸上的突变可能造成对基因编码产物的结构和功能的影响^[1]。目前, 国内外关于 MTHFR 基因变异与骨质疏松及骨质疏松性骨折关系的研究结论尚不一致^[2-4]。本研究拟采用以人群为基础的病例-对照研究方法, 探讨 MTHFR 基因的功能性 SNPs 位点(rs1801133 C677T 和 rs1801131 A1298C)与我国苏州汉族人群绝经后骨质疏松易感性的关系, 进一步阐明绝经后骨质疏松症的可能分子机制, 为今后实施目标明确的个性化防治提供理论基础和新的线索。

1 对象和方法

1.1 对象

选择苏州市金阊区、相城区、吴中区有常住户口并长期居住在抽样点的 45~70 岁自然绝经妇女。排

除有影响骨代谢的疾病及其他需长期治疗的严重慢性疾病、调查前 6 个月服用过激素类药物及钙制剂等影响骨代谢药物、近 6 个月内有骨折史者。共有 261 例对象纳入调查。

1.2 方法

所有研究对象经知情同意告知和确认后进行体重、身高、腰围、臀围等基本指标测量, 应用以色列 Sunlight Medical Ltd 公司生产的 Omnisense 7000s 型骨定量超声仪测定桡骨远端超声速度(speed of sound, SOS)来反映骨密度, 根据仪器报告显示 T 值(与同性别年轻人骨密度平均值之比)分为 3 组, T 值 ≥ -1.0 的为骨量正常, T 值为 $-1.0 \sim -2.5$ 为骨量减少, T 值 ≤ -2.5 为骨质疏松。根据骨密度的检查结果, 将研究对象分为两组, 即骨质疏松组和对照组, 对照组包括骨量正常和骨量减少者。

对每一个研究对象进行外周静脉血采集, 均用真空抗凝(EDTA)采血管, 采集量为 3~5 ml。分装于 1.5 ml 的 EP 管中, 置入 -80°C 冰箱冷冻贮存备用。

采用 AxyPrep 血基因组 DNA 小量试剂盒(杭州爱思进生物技术有限公司)提取 DNA。MTHFR 功能性 SNPs 位点的基因型分析采用 TaqMan 方法, 引物和探针的序列如下(南京冀螯生物技术有限公司合成, 表 1)。

表 1 实时荧光定量 PCR 中引物及探针

Table 1 Primers and probes used for mRNA quantification by real-time PCR

| 多态性位点 | 引物序列(5'→3') | 探针序列 |
|-----------|-----------------------------|---------------------------------------|
| Rs1801133 | 上游: GACCTGAAGCACTTGAAGGAGAA | P-G FAM-ATGATGAAATCGGCTCCCGCA-Tamra |
| | 下游: CACAAAGCGGAAGAATGTGTCA | P-A HEX-TGATGATGAAATCGACTCCCGCA-Tamra |
| Rs1801131 | 上游: GGAGGAGCTGCTGAAGATGTG | P-T FAM- AAGACACTTTCTTCACTG-MGB |
| | 下游: TCTCCGAGAGGTAAGAACAAA | P-G HEX- AGACACTTGCTTAC-MGB |

扩增参数: 50°C 预热 2 min, 95°C 预变性 10 min, 然后 95°C 变性 15 s, 60°C 复性 1 min, 共 40 个循环, 最后在荧光定量 PCR 仪(7900 型, 美国 ABI 公司)上检测荧光信号。每次检测至少设置 3 个空白对照和阳性对照。基因分型结果经 10% 抽样复核, 对结果不一致的样本重新检测。基因型分析采用 Sequence Detector System 2.3 软件(美国 Applied Biosystems 公司)。

1.3 统计学方法

采用 STATA11.0 软件进行统计学分析。根据 Hardy-Weinberg 定律, 比较各组基因型和等位基因频率的实际数与预期数, 了解各基因型在人群中遗传平衡符合程度。分析骨质疏松相关因素以及各基因型在病例与对照之间分布频率的差异, 运用多因

素 Logistic 回归计算 OR 值与 95% 可信区间, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基本资料

骨质疏松组有 92 例, 患病率为 35.25%, 对照组共 169 例, 基本资料见表 2。

2.2 MTHFR 基因型频率和 Hardy-Weinberg 平衡的符合程度

MTHFR rs1801133 位点(677C>T)基因型以及 rs1801131 位点(1298A>C)基因型在对照组中的频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律 ($P = 0.29; P = 0.50$, 表 3)。

表2 研究对象基本资料

Table 2 Descriptive characteristics of the study subjects

| 项目 | 骨质疏松组(n=92) | 对照组(n=169) |
|-------------------------|------------------------------|-----------------|
| SOS值(m/s) | 3 793.91 ± 80.5 ^b | 4 043.68 ± 94.1 |
| 年龄(岁) | 60.23 ± 5.26 ^b | 58.01 ± 5.70 |
| 初潮年龄(岁) | 15.14 ± 1.85 | 15.27 ± 1.85 |
| 绝经年龄(岁) | 51.16 ± 2.94 | 50.51 ± 3.37 |
| 绝经年限(年) | 10.64 ± 5.81 ^b | 6.64 ± 5.95 |
| 分娩次数(次) | 1.40 ± 0.59 ^b | 1.22 ± 0.49 |
| 体重(kg) | 59.26 ± 8.70 | 58.99 ± 8.27 |
| 腰围(cm) | 82.59 ± 9.56 ^a | 80.29 ± 8.62 |
| BMI(kg/m ²) | 23.43 ± 3.03 | 23.30 ± 3.13 |
| 腰臀比(WHR) | 0.86 ± 0.06 | 0.85 ± 0.06 |

与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$ 。

表3 Hardy-Weinberg 平衡检验

Table 3 Hardy-Weinberg equilibrium test (n)

| | rs1801133 位点基因型 | | | rs1801131 位点基因型 | | |
|------------|-----------------|-------|-------|-----------------|-------|------|
| | CC | CT | TT | AA | AC | CC |
| 实际值 | 72 | 79 | 18 | 114 | 48 | 7 |
| 期望值 | 73.56 | 75.87 | 19.56 | 112.69 | 50.63 | 5.69 |
| χ^2 值 | | 0.59 | | | 0.46 | |
| P 值 | | 0.29 | | | 0.50 | |

2.3 骨质疏松组和对照组 MTHFR 中两个多态性位点基因型比较

MTHFR C677T 的 3 种基因型频率在骨质疏松组中分别为 35.87% (CC)、41.30% (CT) 和 22.83% (TT), 而对照组中基因型频率分别为 42.60% (CC)、46.15% (CT) 和 11.24% (TT)。研究显示 MTHFR C677T 基因型多态位点与骨质疏松发生风险有关, T 等位基因频率在病例组 (43.48%) 较对照组 (34.02%) 明显增高 ($P = 0.039$)。与携带 CT/CC 基因型者比较, 携带 TT 基因型者罹患骨质疏松的风险增加了 2.37

倍 (调整 OR=2.37, 95%CI=1.15~4.87, 表 4)。

MTHFR A1298C 的 3 种基因型频率在骨质疏松组中分别为 70.65% (AA)、23.91% (AC) 和 5.43% (CC), 而对照组为 67.46% (AA)、28.40% (AC) 和 4.14% (CC)。A1298C 基因型多态位点和骨质疏松易感性无明显相关 ($P = 0.787$)。

2.4 MTHFR 基因 C677T 多态性与骨质疏松易感性的分层分析

由于 MTHFR 基因 C677T 的多态位点与骨质疏松的发生风险有关, 进一步分层分析发现, 这种增加发病风险的作用在年龄 ≤ 60 岁 (调整 OR = 3.41, 95% CI = 1.31~8.87) 和中心性肥胖 (WHR ≥ 0.80) 的女性 (调整 OR = 2.37, 95% CI = 1.13~4.98) 中更为明显 (表 5)。

3 讨论

MTHFR 是一种黄素依赖蛋白, 定位于染色体 1p36.3^[1], 作为同型半胱氨酸代谢再甲基化途径中的关键酶, 普遍存在于人、动物及其他原核、真核生物体内, 哺乳类动物以肝脏分布最多, 能将 5, 10-亚甲基四氢叶酸还原为 5-亚甲基四氢叶酸, 为 Hcy 转变为蛋氨酸参加代谢提供甲基, 此环节受阻可导致 Hcy 在体内蓄积, 从而引起一系列病理生理过程, 与多种疾病的发生有一定关联^[5-8]。本研究从分子流行病学角度, 探讨了 MTHFR 基因的 2 个 SNPs (C677T 和 A1298C) 与绝经后妇女骨质疏松发病风险之间的关系。

MTHFR C677T 是一个最常见的不耐热错义突变, 能引起酶的耐热性及活性改变。该多态性位点存在两种等位基因, 即野生型 C 与突变型 T, 组合为 3 种基因型: TT、CT 和 CC。该突变基因在人群中呈多

表4 病例组和对照组中 MTHFR 两个多态性位点基因型比较

Table 4 Comparison of MTHFR genotype among cases of osteoporosis and controls

| 基因型 | 骨质疏松组 | | 对照组 | | P 值 ^a | 调整 OR (95%CI) ^b |
|--------|-------|-------|-----|-------|------------------|------------------------------|
| | n | % | n | % | | |
| A1298C | | | | | | |
| AA | 65 | 70.65 | 114 | 67.46 | | |
| AC | 22 | 23.91 | 48 | 28.40 | 0.467 | 0.86(0.47~1.59) |
| CC | 5 | 5.43 | 7 | 4.14 | 0.761 | 1.39(0.40~4.80) |
| AC/CC | 27 | 29.35 | 55 | 32.54 | 0.595 | 0.93(0.52~1.65) |
| C677T | | | | | | |
| CC | 33 | 35.87 | 72 | 42.60 | | |
| CT | 38 | 41.30 | 78 | 46.15 | 0.832 | 1.21(0.67~2.19) |
| TT | 21 | 22.83 | 19 | 11.24 | 0.019 | 2.63(1.20~5.77) |
| CC/CT | 71 | 77.17 | 150 | 88.76 | 0.013 | 2.37(1.15~4.87) ^c |

^a: 基因型分布和等位基因频率用 χ^2 检验; ^b: Logistic 回归模型对年龄、BMI、WHR 及产次等进行调整; ^c: 以 TT 基因型为参照基因型。

表 5 MTHFR 基因 C677T 多态性与 OP 易感性的分层分析
Table 5 Stratified analyses of MTHFR C677T polymorphisms and osteoporosis risk [OP/对照, n(%)]

| 变量 | n | TT | TC/CC | P | 调整 OR(95%CI)* |
|-------------------------|--------|--------------------|---------------------|-------|------------------|
| 年龄(岁) | | | | | |
| ≤60 | 49/120 | 11/11(22.44/9.17) | 38/109(77.55/90.83) | 0.012 | 3.41(1.31~8.87) |
| >60 | 43/49 | 10/8(23.26/16.33) | 33/41(76.74/83.67) | 0.558 | 1.38(0.47~4.09) |
| BMI(kg/m ²) | | | | | |
| <24 | 63/109 | 15/14(23.81/12.84) | 48/95(76.19/87.16) | 0.066 | 2.25(0.95~5.34) |
| ≥24 | 29/60 | 6/5(20.69/8.33) | 23/55(79.31/91.67) | 0.137 | 2.70(0.73~9.96) |
| WHR | | | | | |
| <0.80 | 18/30 | 1/1(5.56/3.33) | 17/29(94.44/96.67) | 0.991 | 1.02(0.04~23.99) |
| ≥0.80 | 74/139 | 20/18(27.03/12.95) | 54/121(72.97/87.05) | 0.023 | 2.37(1.13~4.98) |
| 产次 | | | | | |
| 0~1 | 57/132 | 14/15(24.56/11.36) | 43/117(75.44/88.64) | 0.042 | 2.39(1.03~5.52) |
| ≥2 | 35/37 | 7/4(20.00/10.81) | 28/33(80.00/89.19) | 0.290 | 2.10(0.53~8.34) |

*:对年龄、BMI、WHR 和产次等进行调整。

态性分布,在不同国家、同一国家不同地区、同一地区不同民族或种族中的分布有显著性差异^[9-11],其与骨质疏松和骨质疏松性骨折易感性的研究结论也不尽相同^[4,12-13]。本研究发现,病例组 MTHFR C677T 基因型构成与对照组的基因型构成之间存在差异,具有统计学意义($P < 0.05$),携带 MTHFR 677TT 基因型的个体与携带 CT/CC 基因型者比较,罹患骨质疏松的风险增加了 2.37 倍(调整OR=2.37,95%CI = 1.15~4.87)。T 等位基因频率在病例组(43.48%)较对照组(34.02%)显著增高($P = 0.039$)。与 Huang 等^[14]和 Shiraki 等^[15]的研究结果相符,进一步证实了绝经后妇女 MTHFR 基因 C677T 位点突变与骨质疏松的发生存在相关性,并提示 T 等位基因可能是骨质疏松发生的危险因素。

进一步的分层分析发现,在 60 岁以下的女性中携带 MTHFR 677TT 基因型的个体相对于携带 677CT 和 677CC 基因型的个体,其骨质疏松的发病风险增加。在 WHR ≥ 0.80 的女性,即存在中心性肥胖的女性中携带 MTHFR 677TT 基因型的个体罹患骨质疏松的风险增加了 2.37 倍(调整 OR = 2.37, 95%CI = 1.13~4.98)。绝经后脂肪对骨密度的影响尚存在争议,其对骨密度可能的影响机制亦不明确。Steinbuch 等^[16]在采用皮质激素治疗的一系列研究中发现,脂肪的向心性分布常常伴有骨质疏松的形成,提示脂肪的向心性分布和骨质疏松的发生可能存在部分相同的发病机制。Kim 等^[17]的研究结果显示,对绝经后妇女骨密度起主要作用的是体重中的瘦组织,即骨骼肌,而非脂肪。骨骼肌的收缩力量可对骨组织产生应力,根据 Wolf 定律,骨组织随着应力分布的方向进行骨的重建,使骨的强度能适应这一力

学环境。如果脂肪在体重中的比重较大,相对地作为瘦组织主要成分的骨骼肌则相应减少。脂肪分解代谢中雌激素对骨的正性作用可能远不及骨骼肌减少带来的负面影响。本研究结果为进一步确证该观点提供了分子流行病学方面的证据。

A1298C 突变是另一个影响 MTHFR 活性的错义变异,一般认为该位点多态性对酶活性的影响小于 C677T 多态性。MTHFR A1298C 基因多态与骨质疏松及骨质疏松性骨折的关联研究不多,结果也不尽相同^[18-19]。本研究结果表明 MTHFR A1298C 的 3 种基因型分布在病例组和对照组之间没有统计学差异,与 Gjesdal 等^[19]对挪威 3 070 名女性进行的 1 项髌部骨密度与血浆 Hcy、叶酸、维生素 B₁₂、MTHFR 基因多态性之间关系的研究结论一致。

综上所述,MTHFR C677T 多态与苏州地区绝经后妇女骨质疏松的发病风险存在明显关联,携带 MTHFR 677TT 基因型的个体较携带 677CT 和 677CC 基因型的个体的发病风险明显增加,而 A1298C 却对发病风险没有显著影响。

[参考文献]

[1] Goyette P, Sumner JS, Milos R, et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification [J]. Nat Genet, 1994, 7 (2): 195-200

[2] Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, et al. The 1298A > C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): *in vitro* expression and association with homocysteine [J]. Atherosclerosis, 2001, 156(2): 409-415

[3] Abrahamsen B, Madsen JS, Tofteng CL, et al. A common methylenetetrahydrofolate reductase (C677T) polymorphism is associated with low bone mineral density and in-

- creased fracture incidence after menopause:longitudinal data from the Danish osteoporosis prevention study [J]. *J Bone Miner Res*,2003,18(4):723-729
- [4] Villadsen MM,Bünger MH,Carstens M,et al. Methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR) C677T polymorphism is associated with osteoporotic vertebral fractures,but is a weak predictor of BMD [J]. *Osteoporos Int*,2005,16(4):411-416
- [5] Shiraki M,Urano T,Kuroda T,et al. The synergistic effect of bone mineral density and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism (C677T) on fractures [J]. *J Bone Miner Metab*,2008,26(6):595-602
- [6] 董素芹,管立学,杜欣莹,等. 红细胞叶酸水平及 MTHFR 基因多态性与不明原因重复性自然流产的关系[J]. *中华围产医学杂志*,2006,9(5):315-319
- [7] 廖伟娇,黄韶宽,陈盛强,等. 同型半胱氨酸和 MTHFR 基因多态性与 Alzheimer 病的关系[J]. *中国优生与遗传杂志*,2004,12(3):13-15
- [8] 孙家忠,徐焱成,朱宜莲,等. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与糖尿病合并冠心病的相关性[J]. *武汉大学学报(医学版)*,2010,31(2):174-178
- [9] Schneider JA,Rees DC,Liu YT,et al. Worldwide distribution of a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation[J]. *Am J Hum Genet*,1998,62(5):1258-1260
- [10] Robien K,Ulrich CM. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and leukemia risk;a HuGE minireview[J]. *Am J Epidemiol*,2003,157(7):571-582
- [11] 于佳梅,王新春,陈白宾,等. 中国 5 个民族亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态的研究 [J]. *人类学学报*,1998,17(3):242-246
- [12] Riancho JA,Valero C,Zarrabeitia MT. MTHFR polymorphism and bone mineral density:meta-analysis of published studies [J]. *Calcif Tissue Int*,2006,79(5):289-293
- [13] Jorgensen HL,Madsen JS,Madsen B,et al. Association of a common allelic polymorphism (C677T) in the methylenetetrahydrofolate reductase gene with a reduced risk of osteoporotic fractures. A case control study in Danish postmenopausal women [J]. *Calcif Tissue Int*,2002,71(5):386-392
- [14] Huang QY,Li GH,Kung AW. Multiple osteoporosis susceptibility genes on chromosome 1p36 in Chinese [J]. *Bone*,2009,44(5):984-988
- [15] Shiraki M,Urano T,Kuroda T,et al. The synergistic effect of bone mineral density and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism (C677T) on fractures [J]. *J Bone Miner Metab*,2008,26(6):595-602
- [16] Steinbuch M,Youket TE,Cohen S,et al. Oral glucocorticoid use is associated with an increased risk of fracture [J]. *Osteoporos Int*,2004,15(4):323-328
- [17] Kim CJ,Oh KW,Rhee EJ,et al. Relationship between body composition and bone mineral density (BMD) in perimenopausal Korean women [J]. *Clin Endocrinol*,2009,71(1):18-26
- [18] Zhu K,Beilby J,Dick IM,et al. The effects of homocysteine and MTHFR genotype on hip bone loss and fracture risk in elderly women [J]. *Osteoporos Int*,2009,20(7):1183-1191
- [19] Gjesdal CG,Vollset SE,Ueland PM,et al. Plasma total homocysteine level and bone mineral density:the Hordaland Homocysteine Study [J]. *Arch Intern Med*,2006,166(1):88-94

[收稿日期] 2012-02-17