

雌激素受体 α 基因 Pvu II 多态性与心衰绝经妇女脆性骨折的关系

吕斌, 陈建, 周正, 徐涛, 黄逸凡, 凡进, 殷国勇*

南京医科大学第一附属医院骨科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的:探讨雌激素受体 α (estrogen receptor- α , ESR1)基因 Pvu II 多态性(rs2234693, C>T)对合并心衰的老年绝经妇女脆性骨折的影响。方法:选取2009—2014年>60岁的160例心衰绝经患者,其中80例发生骨折和80例未发生骨折,分别为骨折组和对照组,用聚合酶链反应-限制性酶切长度多态性分析方法,对两组患者 ESR1 基因 Pvu II 多态性(rs2234693, C>T)进行观察。结果:脆性骨折在有吸烟史和既往有脆性骨折史的人群中更为常见,而在规律锻炼的人群中发生较少。83.75%的骨折患者含有 Pvu II T 等位基因,而对照组只含 62.50%,并且 rs2234693T 等位基因携带者的骨折风险显著增加($P<0.05$)。与正常基因型相比,CT+TT 基因型患者骨折风险显著增加($P=0.036$,调整后的OR=1.323,95%CI=1.263~2.787)。进一步分层分析发现在年龄较低人群(≤ 67 岁)和非吸烟者中,CT+TT 基因型与骨折风险的关联更为显著。结论:ESR1 基因 Pvu II 多态性(rs2234693, C>T)增加了心衰绝经妇女的骨折易感性。

[关键词] 雌激素受体;绝经妇女;心衰;脆性骨折;基因多态性

[中图分类号] R683

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)08-1102-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20180817

Association between estrogen receptor alpha gene Pvu II polymorphism and fragility fracture in postmenopausal women with heart failure

Lü Bin, Chen Jian, Zhou Zheng, Xu Tao, Huang Yifan, Fan Jin, Yin Guoyong*

Department of Orthopedics, the First Affiliated of NMU, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To evaluate the effect of the Pvu II polymorphism (rs2234693, C>T) of the estrogen receptor alpha (ESR1) gene on fragility fractures in elderly postmenopausal women with heart failure (HF). **Methods:** This was a hospital-based case-control study of postmenopausal women > 60 years of age with HF, including 80 fracture patients and 80 controls between January 2009 and January 2014. The Pvu II genotype was determined using a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay. **Results:** Fragility fracture was more common in smokers and those with a history of fragility fracture and less common in subjects who exercised daily. The Pvu II T allele was present in 83.75% of patients with fractures vs. 62.50% of controls. Carriers of the variant rs2234693T allele had increased risk of fracture ($P<0.05$). Compared with the common genotype, the CT+TT rs2234693 genotype was associated with significantly increased risk of fracture ($P=0.036$, adjusted odds ratio=1.323, 95% confidence interval=1.263~2.787). In stratified analyses, the association between the risk of fracture and the rs2234693 variant was more prominent in younger individuals (≤ 67 years) and non-smokers. **Conclusion:** The Pvu II polymorphism (rs2234693, C>T) of the ESR1 gene may contribute to the susceptibility of fragility fractures in elderly postmenopausal women with HF.

[Key words] estrogen receptor; postmenopausal women; heart failure; fragility fracture; gene polymorphisms

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(08): 1102-1106]

雌激素是人体内重要的性激素,也是调节骨代谢的重要激素之一^[1]。绝经后妇女因雌激素水平低

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81472080)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: guoyong_yin@sina.com

落,骨质疏松性脆性骨折发生率较高,其发病率逐年上升。术前合并心力衰竭可以加重手术难度及围手术期风险。老年绝经骨折患者由于心功能不全将推迟手术日期,甚至无法进行手术,增加了长期卧床并发症,严重影响了患者的生活质量。其中

雌激素受体 α (estrogen receptor- α , ESR1)突变可导致骨密度明显下降^[2]。研究显示约1/3的绝经妇女会因骨质疏松而发生脆性骨折^[3],严重影响了绝经妇女的生活质量,ESR1 Pvu II (rs2234693, C>T)和 Xba I (rs9340799, A>G)位点基因多态性与骨折之间关系已经广泛报道^[4],但是Pvu II位点突变是否增加绝经妇女的骨折风险仍存在争议,后者对心衰人群骨折的影响也未见报道。因此,本研究将探讨Pvu II位点多态性对合并心衰的老年绝经患者脆性骨折的影响。

1 对象和方法

1.1 对象

研究对象为2009—2014年>60岁的160例伴有心衰的绝经患者,均来自苏州九龙医院,其中80例同时合并脆性骨折,为骨折组;另外80例无骨折,为对照组。本研究获得所有参与者的知情同意。

入选标准:绝经所致的原发性骨质疏松症患者;符合New York Heart Association(NYHA)分级中II~IV级症状,射血分数 $\leq 40\%$,脑钠尿肽(brain natriuretic peptide, BNP)浓度 ≥ 150 pg/mL (NTproBNP浓度 ≥ 600 pg/mL);或者既往12个月内因心衰住院的患者,本次入院BNP浓度 ≥ 100 pg/mL (NTproBNP浓度 ≥ 400 pg/mL)。排除标准:暴力性损伤所致的骨折,如车祸、高处坠落等非骨质疏松性骨折;继发性骨质疏松病因,如结缔组织疾病、甲旁亢、药物等;严重肝肾疾病;其他慢性炎症性疾病、感染等,如类风湿、结核、骨髓炎等。

1.2 方法

1.2.1 临床数据收集

详细记录每个患者的年龄、绝经年龄、体重指数(body mass index index, BMI)、高血压病史(收缩压 > 140 mm Hg或者舒张压 > 90 mm Hg或者正在服用降压药)、吸烟史(吸烟每天 > 10 支、持续时间 > 2 年)、既往脆性骨折史(入组前6个月由于轻微外伤所致的非暴力性骨折、有典型影像学诊断依据)、日常运动情况(规律锻炼根据既往文献报道的标准进行判断^[5],如每天行走3 km,或者有氧运动每天30 min、每周3次以上等)以及钙摄入情况(每天钙摄入 > 400 IU或者其他替代性药物、持续时间 > 2 年)。

1.2.2 血液学检测

受试者均隔夜禁食10 h,次日清晨空腹抽取外周静脉血20 mL,分离血浆和白细胞, -80 °C保存,备用。空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG)、胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglycerides, TG)、

高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein-cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)等生化指标的测定结果均由本院检验科提供。肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)通过ELISA法测定(试剂盒由上海科星生物技术有限公司提供)。

1.2.3 基因分型

ESR1 Pvu II (rs2234693, C>T)基因多态性采用聚合酶链反应-限制性片断长度多态性法(PCR-RFLP)进行分析。根据人雌激素受体基因DNA序列设计引物,上游引物:5'-CTGCCACCCTATCTGTATCTTTTCCTATTCACC-3',下游引物:5'-TCTT-TCTCTGCCACCCTGGCGTCGATTATCTGA-3'。DNA提取采用QIAampDNA全血提取试剂盒(QIAGEN51106,美国),严格按照说明书步骤要求操作。PCR反应体系为20 μ L,扩增后用紫外线凝胶图像分析系统分析并保存。随后取PCR产物1 μ g分别进行Pvu II酶切,酶切总体积为20 μ L,置入电热恒温水浴箱中,反应温度为37 °C,消化8 h。酶切终止后应用1.5%琼脂糖凝胶水平电泳,100 V电压电泳30 min,然后用紫外线凝胶图像分析系统分析基因型。CC型可见单一条带1.3 kb,CT型可见1.3 kb、850 bp和450 bp 3条带,TT型可见850 bp和450 bp 2条带。

1.3 统计学方法

采用SPSS20.0统计软件进行数据分析,计量结果采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,非正态分布采用中位数表示。骨折组和对照组的人群计量结果采用单因素分析 t 检验,计数结果采用 χ^2 检验。运用多因素Logistic回归模型研究多种临床因素与骨折发生之间的关系,结果以比值比(OR)和95%可信区间(95% CI)表示。

运用Hardy-Weinberg平衡检验确认样本的群体代表性,运用基因计数法分别统计病例组和对照组基因型和等位基因频率,采用 χ^2 检验进行分析。运用woolf近似方法和多因素Logistic回归模型研究不同基因型与骨折发生之间的关系,结果以OR和95% CI表示。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

骨折组和对照组患者年龄、绝经年龄、BMI、FPG、TG、TC、HDL-C、LDL-C、TNF- α 、IL-6等指标、

高血压人群分布均没有显著差异。骨折组吸烟者(20.00%)和既往有骨折史患者(40.00%)比例明显高于对照组(分别为8.75%和16.25%),而骨折组日常锻炼人群(65.00%)明显少于对照组(82.50%,表1)。

2.2 骨折风险因素分析

将年龄、绝经年龄、BMI、吸烟史、高血压病史、既往骨折史、日常锻炼情况、钙摄入作为骨折发生的影响因素进行多因素 Logistic 回归分析,结果显示吸烟和既往骨折史是脆性骨折的高危因素(分别为OR=1.145, 95%CI=1.082~1.479; OR=1.897, 95%CI=1.786~2.001),而规律锻炼则可以减少骨折的发生风险(OR=0.479, 95%CI=0.425~0.512,表2)。

2.3 基因型分布

对照组基因型频率遵循 Hardy-Weinberg 平衡($P > 0.05$),具有群体代表性。骨折人群CC型基因占16.25%,CT型占42.5%,TT型占41.25%;对照组人群CC型基因占37.5%,CT型占48.75%,TT型占13.75%。CC、CT、TT在骨折患者和对照人群中存在显著差异($P < 0.05$)。

2.4 ESR1 Pvu II (rs2234693, C>T)基因型和等位基因与骨折风险的关系

经过 Logistic 回归分析矫正年龄、绝经年龄、BMI、吸烟史、高血压病史、既往骨折史、日常锻炼情况、钙摄入的影响后,突变体TT基因型和T等位基因相对于CC基因型和C等位基因显著增加了骨折发生风险(TT vs. CC: $P=0.028$,调整后OR=2.491,

表1 一般临床资料

指标	骨折组(n=80)	对照组(n=80)	P值
年龄(岁)	67.51 ± 5.92	67.59 ± 4.86	0.928
绝经年龄(岁)	48.83 ± 4.36	49.26 ± 3.74	0.514
BMI(kg/m ²)	23.47 ± 3.79	24.18 ± 3.64	0.230
空腹血糖(mmol/L)	5.92 ± 2.27	5.56 ± 1.56	0.231
胆固醇(mmol/L)	5.04 ± 1.02	5.23 ± 0.99	0.229
甘油三酯(mmol/L)	2.03 ± 1.00	2.06 ± 1.14	0.862
高密度脂蛋白胆固醇(mmol/L)	1.74 ± 0.55	1.74 ± 0.52	1.000
低密度脂蛋白胆固醇(mmol/L)	3.15 ± 0.86	3.29 ± 0.98	0.340
TNF-α(pg/mL)	1.92 ± 0.85	2.14 ± 1.65	0.298
IL-6(pg/mL)	3.64 ± 2.28	3.92 ± 5.17	0.662
吸烟[n(%)]	16(20.00)	7(8.75)	0.043
日常锻炼[n(%)]	52(65.00)	66(82.50)	0.012
既往骨折史[n(%)]	32(40.00)	13(16.25)	0.001
高血压病[n(%)]	39(48.75)	41(51.25)	0.752
钙摄入[n(%)]	43(53.75)	44(55.00)	0.874

95%CI=2.132~4.216; T vs. C: $P < 0.001$,调整后OR=2.705, 95%CI=1.721~4.250);CT和TT基因型个体比野生基因型CC个体骨折发生风险高($P=0.036$,调整后OR=1.323, 95%CI=1.263~2.787,表3)。

2.5 ESR1 Pvu II rs2234693基因型在骨折组和对照组中的分层分析

经过 Logistic 回归分析矫正年龄、绝经年龄、

表2 多因素 Logistic 回归分析骨折的危险因素

Table 2 The Logistic regression analysis of multiple factors for fracture

指标	未调整OR(95%CI)	P值	调整后OR(95%CI)	P值
吸烟	2.607(1.009~6.738)	0.043	1.145(1.082~1.479)	0.046
日常锻炼	0.394(0.188~0.823)	0.012	0.497(0.425~0.512)	0.031
既往骨折史	3.436(1.633~7.227)	0.001	1.897(1.786~2.001)	0.012

表3 ESR1 Pvu II (rs2234693, C>T)基因型和等位基因与骨折的关系

Table 3 Genotype and allelotype of ESR1 Pvu II (rs2234693, C>T) polymorphism and their associations with risk of fracture

基因型	未调整OR(95%CI)	P值	调整后OR(95%CI)	P值
CC	1.00			
CT	2.012(0.907~4.464)	0.083	1.014(0.900~2.034)	0.103
TT	6.923(2.696~17.776)	<0.001	2.491(2.132~4.216)	0.028
CT+TT	3.092(1.465~6.525)	0.002	1.323(1.263~2.787)	0.036
CC+CT	1.00			
TT	4.404(2.026~9.575)	<0.001	1.884(1.589~2.458)	0.031
C	1.00			
T	2.705(1.721~4.250)	<0.001		

BMI、吸烟史、高血压病史、既往骨折史、日常锻炼情况、钙摄入的影响后,进行分层分析评价 Pvu II (rs2234693, C>T)多态性在不同年龄层次(67岁)、是否吸烟、是否进行日常锻炼和既往有无骨折的患者中对骨折发生的影响。在 ≤ 67 岁和非吸烟患者中,CT+TT基因型显著增加了骨折风险(分别为 $P=0.038$,调整后 $OR=3.344$, $95\%CI=1.921\sim 4.128$; $P=0.022$,调整后 $OR=2.987$, $95\%CI=1.856\sim 4.643$),而对 > 67 岁和吸烟患者骨折发生无显著影响(分别为 $P=0.624$, $P=0.847$)。另外,CT+TT基因型对既往有骨

折患者或者无骨折史人群骨折发生无影响(表4)。

3 讨论

心衰发生率随着年龄增加而上升^[6],据统计,美国40岁以上人群有20%会发生心衰^[7]。老年人的心肌缺血和心肌代偿能力降低,各种心脏疾病使得心脏部分功能单位受损,心脏功能下降,加剧心功能恶化。术前及术中出血可加重缺血对心脏带来的损害,围手术期输液进一步加重了心脏容量负荷并诱发心力衰竭,以上过程可以在原有心脏疾病基

表4 ESR1 PvuII rs2234693基因型在骨折组和对照组中的分层分析
Table 4 Stratified analyses for ESR1 PvuII rs2234693 genotypes in cases and controls

指标	(CT+TT)/CC for rs2234693		调整后OR(95%CI)	P值
	骨折组[n(%)]	对照组[n(%)]		
年龄(岁)				
≤ 67	38(47.50)/5(6.25)	23(28.75)/20(25.00)	3.344(1.921~4.128)	0.038
> 67	29(36.25)/8(10.00)	27(33.75)/10(12.50)	1.134(0.311~2.234)	0.624
吸烟				
是	10(12.50)/6(7.50)	4(5.00)/3(3.75)	1.198(0.199~4.618)	0.847
否	57(71.25)/7(8.75)	46(57.5)/27(33.75)	2.987(1.856~4.643)	0.022
日常锻炼				
是	43(53.75)/9(11.25)	38(47.50)/18(22.50)	1.458(0.647~3.201)	0.248
否	24(30.00)/4(5.00)	12(15.00)/12(15.00)	1.225(0.818~7.784)	0.107
既往骨折史				
是	26(32.50)/6(7.5)	8(10.00)/5(6.25)	1.887(0.632~8.748)	0.229
否	41(51.25)/7(8.75)	42(52.50)/25(31.25)	1.312(0.568~4.447)	0.141

础上发生而导致围手术期急性心衰。本研究中,老年绝经患者多合并多种内科疾病可诱发或者加重心力衰竭。因此,寻找心衰患者骨折发生风险,采取早期干预措施,显得尤为迫切。

东亚绝经妇女进行雌激素受体基因Pvu II多态性研究显示:雌激素受体 α 基因多态性关系到绝经妇女的骨密度,提示预测和早期诊断骨质疏松脆性骨折与雌激素受体 α 基因多态性有显著关联。虽然当前已有很多研究关注雌激素受体 α 基因多态性与骨密度的关系,但雌激素受体 α 基因多态性和骨密度以及骨质疏松的相关性受到了选择样本的地域环境还有样本范围、数量等因素的制约。同时,既有研究多为雌激素受体基因多态性对脆性骨折的影响,而未充分考虑围手术期雌激素受体基因多态性对心衰合并骨折对各危险因素间的互相干扰对手术结果产生的影响,可能导致研究结果的误差。

雌激素是一种类固醇激素,呈脂溶性,其靶组

织众多,包括生殖系统、骨骼、心血管等。骨是雌激素发挥作用的重要靶器官之一,在成骨细胞、破骨细胞、间叶干细胞、骨细胞中均有雌激素受体的存在,雌激素可通过雌激素受体(ESR)途径发挥抗骨质疏松作用^[8]。国内外对ESR1基因Pvu II和Xba I位点多态性与骨质疏松的关系研究由来已久。其中Pvu II位点多态性主要位于ESR1基因非编码区域,由于其在内含子1由C到T位点突变恰好位于Myb转录因子结合位点上,造成Myb结合减少,抑制了基因转录^[9]。因此,该位点突变人群对于雌激素减少更为敏感。

目前Pvu II位点多态性与脆性骨折之间发生的关系仍存在争议。2015年Deng等^[10]通过meta分析研究认为Pvu II位点多态性与骨折发生无显著关联,而2010年Lei等^[11]通过meta分析研究认为Pvu II位点多态性增加了骨折发生的风险。2003年荷兰一项2 042例前瞻性队列研究发现,ESR1 Pvu II位点

突变增加了骨折易感性。本研究再次证实 ESR1 Pvu II rs2234693T 位点突变增加了伴有心衰的绝经患者的骨折易感性,CT+TT 基因型显著增加了骨折发生风险。

脆性骨折是一个多因素所致的结果,本研究证明吸烟以及既往骨折史是其发生的高危因素。同时我们还发现 Pvu II 位点多态性只增加年轻(≤ 67 岁)患者和非吸烟人群的骨折易感性,而在 > 67 岁和吸烟人群中与骨折发生无关,主要原因可能与其环境暴露因素的累计效应有关^[12]。摔倒所致的骨折是脆性骨折发生的主要诱因,而老年人的躯体平衡协调功能下降是诱导摔倒的重要因素。因此,日常锻炼不仅可以增强骨骼肌力量,而且可以提高老年人群的协调力,减少摔倒的发生^[13],从而减少骨折的发生。

综上所述,既往发生骨折和吸烟增加了脆性骨折的不利因素,而日常锻炼活动将降低骨折的发生率。同时 ESR1 Pvu II (rs2234693, C>T) 位点多态性可以增加老年绝经患者的骨折易感性,这种易感性在伴有心衰的患者骨折表现更加明显。患者 ≤ 67 岁和非吸烟人群是 ESR1 Pvu II (rs2234693, C>T) 位点多态性对于患者骨折的高危因素。本研究纳入病例有限,未针对不同心功能水平进一步分组,因此需要大样本分组研究。

[参考文献]

- [1] Zhou Q, Wu X, Hu J, et al. Abnormal expression of fibrosis markers, estrogen receptor α and stromal derived factor 1/chemokine(C X C motif)receptor 4 axis in intrauterine adhesions[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(1): 81-90
- [2] Correa-Rodriguez M, Schmidt-RioValle J, Rueda-Medina B, et al. Association study of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mass assessed by quantitative ultrasound in young adults[J]. *Rheumatol Int*, 2017, 37(8): 1281-1286
- [3] Akesson K, Marsh D, Mitchell PJ, et al. Capture the fracture: a best practice framework and global campaign to break the fragility fracture cycle [J]. *Osteoporos Int*, 2013, 24(8): 2135-2152
- [4] Wang CL, Tang XY, Chen WQ, et al. Association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density in Chinese women: a meta-analysis[J]. *Osteoporos Int*, 2007, 18(3): 295-305
- [5] Gomes Neto M, Durães AR, Conceição LSR, et al. High intensity interval training versus moderate intensity continuous training on exercise capacity and quality of life in patients with heart failure with reduced ejection fraction: A systematic review and meta-analysis [J]. *Int J Cardiol*, 2018, 15(261): 134-141
- [6] Wang Z, Jin L, Zhou W, et al. A single-center observational study on the efficacy of percutaneous coronary intervention for ischemic heart failure: A cohort study, [J]. *Medicine(Baltimore)*, 2018, 97(13): e0238
- [7] Mehra MR, Goldstein DJ, Uriel N, et al. Two-year outcomes with a magnetically levitated cardiac pump in heart failure[J]. *N Engl J Med*. 2018, 378(15): 1386-1395
- [8] 干旻峰, 宋达玮, 邹俊, 等. 雌激素可通过雌激素受体(ESR)途径发挥抗骨质疏松作用[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(4): 475-479
- [9] Wang Y, Lewin N, Qaoud Y, et al. The oncologic impact of hormone replacement therapy in premenopausal breast cancer survivors: A systematic review [J]. *Breast*, 2018, 12(40): 123-130
- [10] Deng W, Han JC, Chen L, et al. Estrogen receptor alpha gene Pvu II polymorphism and risk of fracture in postmenopausal women: a meta-analysis[J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(1): 1293-1300
- [11] Lei MM, Yang TF, Tu ZQ, et al. Oestrogen receptor-alpha polymorphism and risk of fracture: a meta-analysis of 13 studies including 1279 cases and 6069 controls [J]. *J Int Med Res*, 2010, 38(5): 1575-1583
- [12] Segaud N, Legroux I, Hazzan M, et al. Changes in bone mineral density after kidney transplantation: 2-year assessment of a French cohort [J]. *Osteoporos Int*, 2018, 29(5): 1165-1175
- [13] Zhao R, Feng F, Wang X. Exercise interventions and prevention of fall-related fractures in older people: a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Int J Epidemiol*, 2017, 46(1): 149-161

[收稿日期] 2017-12-13