

雌激素受体基因多态性与女性绝经后骨质疏松症 中医辨证分型关系的研究

安胜军 李 恩 佟晓旭 刘 昆 赵京山

内容提要 **目的**:研究中国绝经后女性雌激素受体基因多态性与绝经后骨质疏松症中医辨证分型的关系。**方法**:对 246 名中国绝经后女性(年龄 44~80 岁,平均 65.8 岁),用分子生物学的方法分析内切酶 *Pvu* II、*Xba* I 限制性长度片段多态性(RFLPs),运用双能 X 线骨吸收法分别测其腰椎(L_1-L_4)和股骨(粗隆间、股骨颈、Ward's 区)骨密度,根据中医虚证辨证分型标准,将研究对象分为肾阴虚型、肾阳虚型和阴阳俱虚型,观察雌激素受体基因多态性与骨密度及中医辨证分型的关系,RFLPs 用 Pp(*Pvu* II)和 Xx(*Xba* I)来表示,限制性部分缺失者用大写字母表示,存在者用小写字母表示。**结果**:PPxx 基因型(21 例)骨密度 Z-score 明显低于其他基因型(225 例),腰椎(-0.71 ± 0.46) g/cm²,粗隆间(-0.31 ± 0.58) g/cm²,股骨颈(-0.84 ± 0.66) g/cm²,Ward's 区(-0.96 ± 0.85) g/cm²,该基因型女性中医辨证属阴阳俱虚型。**结论**:雌激素受体基因 RFLPs 与中医辨证分型有关。

关键词 雌激素受体基因多态性 中医辨证分型 骨质疏松症

Study on Relationship between Estrogen Receptor Gene Polymorphism and Syndrome Differentiation Typing of Female Postmenopausal Osteoporosis in Traditional Chinese Medicine AN Shengjun, LI En, TONG Xiaoxu, et al. *Integrated TCM and WM Basic Theory Department, Hebei Medical University, Shijiazhuang (050017)*

Objective: To study the relationship between estrogen gene polymorphism and TCM Syndrome Differentiation of female postmenopausal osteoporosis in China. **Methods**: Two hundred and forty-six Chinese postmenopausal women, age 44—80 years, mean 65.8 years, using molecular biological method to analyze the endonuclease *Pvu* II, *Xba* I restriction fragment length polymorphisms (RFLPs), with dual X-ray bone mineral density absorption meter to determine the bone mineral densities of lumbar vertebra (L_1-L_4) and femur (intertrochanter, femur neck, Ward's region) separately. The subjects were divided into Kidney Yin deficiency type, Kidney Yang deficiency type and both Kidney Yin-Yang deficiency type, to observe the relationship between TCM and bone density as well as estrogen receptor gene polymorphism, Pp(*Pvu* II) and Xx(*Xba* I) were used to express RFLPs, the capital P and X to express the deficit of restricting sites. **Results**: Bone mineral density of PPxx gene type ($n=21$) was obviously lower than that of other gene types ($n=225$), lumbar (-0.71 ± 0.46) g/cm², intertrochanter (-0.31 ± 0.58) g/cm², femur neck (-0.84 ± 0.66) g/cm², Ward's region (-0.96 ± 0.85) g/cm², the TCM Syndrome Differentiation typing of this gene type belonged to both Kidney Yin-Yang deficiency type. **Conclusion**: Estrogen receptor gene RFLPs is related to TCM Syndrome Differentiation typing.

Key words estrogen receptor gene polymorphisms, TCM Syndrome Differentiation typing, osteoporosis

本研究把雌激素受体基因作为中西医结合的新靶点,探讨中国绝经后女性雌激素受体基因多态性与中医辨证分型在绝经后骨质疏松症诊断和治疗方面的关系。

资料和方法

1 中医辨证分型标准 按照全国中西医结合虚证与老年病专业委员会 1986 年 5 月修订的中医虚证辨证参考标准^[1],分为肾阴虚型、肾阳虚型、阴阳俱虚型;本研究将不具备上述 3 型的条件者规定为不确定型。

2 研究对象 对 1997 年 8 月~1999 年 3 月间 2500 名 44~80 岁长期居住在石家庄市(包括郊县)的女性市民进行流行病学调查,按不同年龄段(5 岁为一龄段)从中随机抽取 300 名,进行健康调查,包括血钙(Ca)、血磷(P)、碱性磷酸酶(ALP)、甲状旁腺激素(PTH)、降钙素(CT)、空腹血糖、肝功能、肾功能等、腰椎和股骨骨密度检查、摄胸腰椎侧位 X 线片(分别以 T_8 和 L_3 为中心)无椎体骨折者。剔除过早绝经(40 岁以前)、进行过卵巢切除术、患有影响骨代谢疾病及服用过影响骨代谢药物者,入选者共计 246 例,平均年龄(65.8 ± 8.1)岁,体重(54.2 ± 5.4)kg,身高(152.6 ± 8.6)cm,绝经时间(16.1 ± 9.0)年,均为城市居民。

3 方法

3.1 骨密度(bone mineral density, BMD)测定 应用双能 X 线吸收骨密度仪(DPX-L, Lunar 美国)测定腰椎(L_1-L_4)和股骨颈(N)、Ward's 区(W)、粗隆间(T)骨密度,Z-score(Z 值,是骨密度与同年龄段人正常骨密度值比较的敏感性参数,数据的平均值被校正为零),由 Lunar DPX-L 内置的软件计算出来,Z 值依年龄(10 年间隔)和体重自动调整, $Z \text{ 值} = P - M/s$,P 是被检查者的 BMD,M 是同年龄段 BMD 正常均值,s 是同年龄段 BMD 正常均值的标准差。

3.2 基因组 DNA 分析 (1)DNA 提取:空腹取外周血分离出白细胞,从白细胞中抽提基因组 DNA。(2)PCR 反应:基因组 DNA $0.1 \mu\text{g}$,缓冲液:10 mmol/L Tris-HCl(pH 9.0),50 mmol/L KCl,2.5 mmol/L Mg^{2+} ,1% Triton X-100,4 种脱氧核苷酸分别为 200 $\mu\text{mol/L}$ 。1 U Taq DNA 聚合酶(华美公司),0.4 $\mu\text{mol/L}$ 低聚核苷酸引物(上游引物:5'-CTGCCACCCTATCTGTATCTTTTCCTATTCTCC-3';下游引物:5'-TCTTTCTCTGCCACCCTGGCGTCGATTATCTGA-3'),PCR 反应条件:变性,94 $^{\circ}\text{C}$,30s;退火,61 $^{\circ}\text{C}$,40s;延伸,72 $^{\circ}\text{C}$,90s,30 个循环(PCR 仪型号:Thermoje T Equibio,奥地利)。(3)酶切:PCR 扩增产物包括雌激素受体基因的内含子 1 与外显子 2,用限制性内切酶(*Pvu* II 和 *Xba* I;华美公司)消化,1.0%凝胶电泳,在 1.3 Kb 片段中检测 *Pvu* II 和 *Xba* I 的限制性长度片段多态性(restriction fragment length polymorphisms, RFLPs)部位。

3.3 中医辨证分型与雌激素受体基因多态性及骨密度关系分析 将被研究的对象分为 4 型:肾阴虚型、肾阳虚型、阴阳俱虚型和三者都不确定型,与经酶 *Pvu* II 和 *Xba* I 消化后的雌激素受体基因多态性及骨密度进行例数对照、归纳和分析。总结各基因型、骨密度与中医辨证分型的规律,揭示传统中医辨证论治的客观规律。

4 统计学方法 应用组间方差分析(ANOVA),检验 3 种或更多的基因与 BMD 及有关生化指标之间的差异,Fisher's 的 PLSD(最小显著差异)试验用于评估 ER 基因的每一种基因型同 BMD Z-score 值之间的关系。当两组之间 BMD、生化指标的差异检测出后,应用 Mann-Whitney's U-test 进行统计分析, $P < 0.05$ 被认为有统计学意义。

结 果

1 RFLPs 结果用 P 或 p 和 X 或 x 表示,限制性部分存在者用小写字母表示,缺失者用大写字母表示,ER 基因 *Pvu* II 内切酶位点多态性电泳结果为:PP 型可见单一条带 1.3kb, Pp 型可见 1.3kb、0.45kb、0.85kb 3 条带,pp 型可见 0.45kb、0.85kb 两条带,ER 基因 *Xba* I 内切酶位点多态性电泳结果为:XX 型可见单一条带 1.3kb,Xx 型可见 1.3kb、0.4kb、0.9kb 3 条带,xx 型可见 0.4kb、0.9kb 两条带。

2 *Pvu* II 各基因型、BMD Z-score 与中医辨证分型之间的关系 见表 1。内切酶 *Pvu* II 酶切后 PP 基因型女性的腰椎和股骨 BMD 有低 Z-score 倾向($PP < Pp < pp$),中医辨证分型属阳虚型(53 例)占 21.5%,(L_1-L_4 , $P = 0.15$;粗隆间, $P = 0.17$,股骨颈, $P = 0.10$;Ward's 区, $P = 0.14$;差异虽无显著性,但反应了一种变化趋势);pp 基因型女性属阴虚型(65 例)占 26.4%;Pp 基因型女性属不确定型(128 例)占 52.0%。

3 *Xba* I 各基因型、BMD Z-score 与中医辨证分型之间的关系 见表 2。内切酶 *Xba* I 酶切后各基因型与 *Pvu* II 各基因型相比,XX 基因型女性有相反倾向($XX > Xx > xx$),中医辨证分型属阴虚型(10 例)占 4.1%,(L_1-L_4 , $P = 0.21$;粗隆间, $P = 0.17$,股骨颈, $P = 0.19$;Ward's 区, $P = 0.16$);xx 基因型女性属阳

表 1 *Pvu* II 各基因型、BMD Z-score 与中医辨证分型之间的关系 (g/cm^2 , $\bar{x} \pm s$)

基因型	例数	BMD Z-score				辨证分型
		L_1-L_4	粗隆间	股骨颈	Ward's 区	
PP	53	-0.53 ± 0.16	-0.15 ± 0.78	-0.48 ± 0.90	-0.59 ± 0.58	阳虚
Pp	128	-0.21 ± 0.99	0.12 ± 0.84	-0.19 ± 0.80	-0.32 ± 0.45	不确定
pp	65	0.22 ± 0.46	0.49 ± 0.57	0.31 ± 0.49	0.16 ± 0.51	阴虚

表 2 Xba I 各基因型 BMD Z-score 与中医辨证分型之间的关系 ($\text{g}/\text{cm}^2, \bar{x} \pm s$)

基因型	例数	BMD Z-score				辨证分型
		L_1-4	粗隆间	股骨颈	Ward's 区	
XX	10	0.48 ± 0.49	0.69 ± 0.66	0.42 ± 0.57	0.30 ± 0.69	阴虚
Xx	84	0.12 ± 0.85	0.39 ± 0.58	0.11 ± 0.66	-0.12 ± 0.87	不确定
xx	152	-0.26 ± 0.58	0.11 ± 0.69	-0.32 ± 0.76	-0.42 ± 0.67	阳虚

表 3 检测出的各基因型 BMD Z-score 与中医辨证分型的关系 ($\text{g}/\text{cm}^2, \bar{x} \pm s$)

基因型	例数	BMD Z-score				辨证分型
		L_1-4	粗隆间	股骨颈	Ward's 区	
ppXX	1	0.79	0.86	0.64	0.59	—
ppXx	3	0.68 ± 0.58	0.75 ± 0.69	0.56 ± 0.61	0.47 ± 0.67	阴虚
PPXX	9	$0.45 \pm 0.72^*$	$0.56 \pm 0.71^{**}$	$0.31 \pm 0.66^{**}$	$0.25 \pm 0.68^{**}$	阴虚
PpXx	58	$0.21 \pm 0.89^*$	$0.24 \pm 0.98^*$	$0.19 \pm 0.99^{**}$	$0.11 \pm 0.96^{**}$	不确定
ppxx	61	$0.16 \pm 1.17^*$	$0.28 \pm 1.05^*$	$-0.12 \pm 1.08^*$	$-0.19 \pm 1.08^*$	不确定
Ppxx	70	-0.18 ± 1.19	$0.11 \pm 1.03^*$	-0.30 ± 1.18	-0.39 ± 1.09	阳虚
PPXx	23	-0.31 ± 0.98	-0.12 ± 0.99	-0.51 ± 0.87	-0.60 ± 1.07	阳虚
PPxx	21	-0.71 ± 0.46	-0.31 ± 0.58	-0.84 ± 0.66	-0.96 ± 0.85	阴阳俱虚

注:与 PPxx 型比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 4 PPxx 基因型与其他各组基因型总和的 BMD Z-score 与中医辨证分型的关系 ($\text{g}/\text{cm}^2, \bar{x} \pm s$)

基因型	例数	BMD Z-score				辨证分型
		L_1-4	粗隆间	股骨颈	Ward's 区	
PPxx	21	$-0.71 \pm 0.46^*$	$-0.31 \pm 0.58^{**}$	$-0.84 \pm 0.66^{**}$	$-0.96 \pm 0.85^{**}$	阴阳俱虚
其他	225	-0.12 ± 0.76	0.38 ± 0.65	-0.16 ± 0.59	-0.25 ± 0.77	阴虚或阳虚 或不确定

注:与其他基因型比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

虚型(152 例)占 61.8%, Xx 基因型女性属不确定型(84 例)占 34.1%;仅就基因型与骨密度而言与日本人报道结果基本相同⁽²⁾。

4 同一研究对象基因复合形式与 BMD Z-score 之间的关系 见表 3。Pvu II 和 Xba I 酶切后复合形式基因型的分布如下:PPXX9 例(3.7%), PPXx23 例(9.3%), PPxx21 例(8.5%), PpXx58 例(23.6%), Ppxx70 例(28.5%), ppXx3 例(1.2%), ppxx61 例(24.8%)和 ppXX1 例(0.4%)。一种基因型 PpXX 在本研究中未检测出, ppXX(1 例)、ppXx(3 例)型由于例数太少,未进入统计。PPxx 基因型比 PPXX、PpXx、ppxx、Ppxx 基因型的 BMD Z-score 明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), 阴阳俱虚型比阴虚型、阳虚型、不确定型的 BMD Z-score 明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果:PPxx 基因型 BMD Z-score 明显低于其他基因型(L_1-4 $P = 0.019$;粗隆间 $P = 0.016$;股骨颈 $P = 0.001$;Ward's 区 $P = 0.004$),根据中医辨证属于阴阳俱虚型。

5 PPxx 基因型与其他各组基因型总和的 BMD Z-score 关系 见表 4。PPxx 基因型比其他基因型的 BMD Z-score 均明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),说明阴阳俱虚型 4 个部位(L_1-4 ,粗隆间,股骨颈,Ward's 区)的骨密度比阴虚型、阳虚型和不确定型都低。

6 各基因型的平均年龄、体重、身高、绝经年数及生化指标的关系 各基因型组间平均年龄、体重、身高、绝经年数及骨代谢生化指标(Ca、P、ALP、PTH、CT)差异均无显著性($P > 0.05$)。

讨 论

1 基因辨证理论提出的意义 随着遗传学和分子生物学的兴起和发展,从基因水平去认识疾病,诊断疾病及治疗疾病越来越受到人们的重视,我们把基因诊断与中医辨证分型结合起来,探讨基因型与辨证分型的关系,提出基因辨证理论⁽³⁾,为中医辨证奠定遗传学和分子生物学基础,使中医学的辨证分型更加客观化和标准化。

2 绝经后骨质疏松症从肾虚辨证论治的理论基础 中医学认为“肾主生殖,肾主骨”,对女性来说,肾主生殖功能指的是肾对卵巢功能的影响,通过肾对卵巢功能的影响达到肾主骨的目的,这就是卵巢功能水平是绝经后骨质疏松发病与否的主要因素⁽⁴⁾。研究表明:雌激素不仅是维持骨量的主要因素,同时也是促进骨骼正常生长发育必不可少的因素⁽⁵⁾。通过对一雌激素受体基因缺陷的男性病例(28 岁)分析发现:该患者骨密度比同年龄正常男性低 3.1 倍标准差,说明雌激素对骨骼的发育、成长及骨量维持过程,对男女两性都

是至关重要的⁽⁶⁾。肾中之精气是女性卵巢功能盛衰的主要物质基础,肾之精气充盈,则卵巢功能旺盛,骨骼强健,反之,则卵巢功能衰竭,骨质疏松。

3 女性绝经过程体现了绝经后骨质疏松从肾虚辨证分型的规律 我们的研究表明:围绝经期女性,多以阴虚为主,这一阶段,由于体内对雌激素分泌不足产生的反应强烈,意味着体内代谢发生了变化,包括骨代谢变化。40~50 岁是卵巢功能变化最快的阶段⁽⁷⁾,这一时期,体内内分泌系统处于代偿期,表现出亢进状态,是阴虚证的具体体现。绝经后女性多以阳虚为主,因为绝经是卵巢功能降低过程中的最终阶段,研究表明:绝经前 5 年卵泡生成素开始上升,一方面维持雌二醇水平,但绝经前 6 个月显著降低⁽⁸⁾,这一时期,体内内分泌处于失代偿期,表现出低下状态,是阳虚证的具体表现。经过代偿期和失代偿期最终导致阴阳俱虚,绝经后 5~10 年以阴阳俱虚为主。

4 雌激素受体基因多态性与辨证论治的关系 我们的研究表明:雌激素受体基因多态性中特定的基因型与肾虚辨证分型有着密切的关系,对实际的辨证论治起指导作用,特别是根据遗传基因的多态性作为组方用药的手段,表明有该多态性时的生物学意义。人类的基因(DNA)存在于细胞核中的染色体上,世代遗传下去,遗传信息存在于碱基序列中,经过长期的进化过程,基因组还在进行各种各样的变化,包括碱基的置换、脱落和重组等,变异的积累产生遗传基因的多态性,这种多态性就决定了出生后的体质(阴虚体质、阳

虚体质等)。所以,从遗传基因多态性分析辨证类型——基因辨证,从某种意义上说增强了辨证论治的准确性和特异性。

参 考 文 献

1. 沈自尹,王文健. 中医虚证辨证参考标准. 中西医结合杂志 1986;6(1): 598.
2. Shinji Kobayashi, Satoshi Inoue, Takayuki Hosoi, et al. Association of mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene. J Bone Mineral Research 1996;11: 306—311.
3. 安胜军,李恩. DNA——中西医结合的根本点. 医学与哲学 2000;21(6): 38—39.
4. Albright F. Postmenopausal osteoporosis. Trans Assoc Am Physic 1940;55: 298.
5. Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, et al. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90: 11162—11166.
6. Smith EP, Boyd J, Frank GR, et al. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen receptor gene in a man. N Engl J Med 1994;331: 1056—1069.
7. Wentz ZC. Management of the menopause. Novak's Textbook of Gynecology. 11th ed. Williams & Wilkins, 1988: 397—402.
8. Rannevik G. A longitudinal study of the perimenopausal transition; Altered profiles of steroid and pituitary hormones, SHBG and bone mineral density. Maturitas 1995;21: 103—113.

(收稿:1999-11-11 修回:2000-03-01)