

ارتباط پلی مورفیسم Taq1 و Apa1 ژن های گیرنده ویتامین D با استئوپروز در خانم های یائسه

دکتر مهناز عباسی*

دکتر شکراله حسنی**

دکتر همایون شیخ الاسلامی***

صفرعلی علیزاده****

زهرا رشوند*****

دکتر زهره یزدی*****

دکتر رضا نجفی پور*****

* استادیار بیماری های روماتولوژی مرکز تحقیقات بیماری های متابولیک دانشگاه علوم پزشکی قزوین
 ** دستیار بیماری های داخلی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
 *** دانشیار بیماری های داخلی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
 **** کارشناس ارشد میکروبیولوژی مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
 ***** کارشناس ارشد ژنتیک پزشکی مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
 ***** استادیار طب کار مرکز تحقیقات بیماری های متابولیک دانشگاه علوم پزشکی قزوین
 ***** استادیار ژنتیک مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

آدرس نویسنده مسؤل: دانشگاه علوم پزشکی قزوین، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، تلفن ۰۲۸۱-۳۳۲۴۹۷۱

Email: r_najafipour@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۰/۱۱

تاریخ دریافت: ۹۰/۲/۲۵

* چکیده

زمینه: پوکی استخوان، شایع ترین اختلال متابولیسم مواد معدنی استخوان است. پلی مورفیسم های مختلف در ژن گیرنده ویتامین D به عنوان یک عامل مهم ژنتیکی می تواند یکی از کنترل کننده های اصلی توده استخوانی باشد.

هدف: مطالعه به منظور تعیین ارتباط بین پلی مورفیسم های Taq1 و Apa1 ژن گیرنده ویتامین D با پوکی استخوان در خانم های یائسه انجام شد. **مواد و روش ها:** در این مطالعه مورد-شاهدی، ۸۰ بیمار از خانم های یائسه مراجعه کننده به درمانگاه روماتولوژی مرکز آموزشی-درمانی بوعلی سینا قزوین در سال ۱۳۸۹ به عنوان گروه مورد و ۸۰ نفر از سایر بیماران مراجعه کننده به این مرکز به عنوان گروه شاهد انتخاب و پس از تکمیل برگه رضایت نامه در مطالعه وارد شدند. تراکم استخوان های مچ دست، گردن استخوان ران و مهره های کمر با استفاده از روش DEXA تعیین شد. (سپس با استفاده از روش PCR RFLP ژنوتیپ های مختلف Taq1 (AA/Aa/aa) و Apa1 (TT/Tt/tt) معین و داده ها با آزمون های آماری مجذور کای و آنوا تحلیل شدند.

یافته ها: ارتباط آماری معنی داری بین پلی مورفیسم های مختلف Apa1 و Taq1 با استئوپروز وجود نداشت. بیماران با ژنوتیپ Taq1(tt) نسبت به بیماران با ژنوتیپ Taq1(Tt) از تراکم استخوان کمتری در استخوان های مچ دست و گردن استخوان ران برخوردار بودند.

نتیجه گیری: با توجه به یافته ها، ارتباط بین پلی مورفیسم های ژنوتیپ های ویتامین D و استئوپروز هنوز ناشناخته است و احتمال دارد عوامل دیگری بر روی تراکم استخوان تأثیرگذار باشند.

کلیدواژه ها: پلی مورفیسم، ژنوتیپ ویتامین D، استئوپروز، تراکم سنجی استخوان

* مقدمه

توده استخوان در اوایل بزرگسالی به بالاترین میزان خود می رسد و به تدریج با افزایش سن کاهش می یابد. در خانم ها به خصوص در دوران یائسگی جذب کلسیم از روده و کلیه به دلیل کاهش استروژن کم می شود و دریافت کلسیم توسط استخوان به کمترین میزان خود می رسد.^(۲)

پوکی استخوان یک نوع اختلال در استخوان است که به صورت کاهش توده (تراکم) استخوانی و افزایش خطر شکنندگی آن تعریف می شود. سازمان جهانی بهداشت، استئوپروز را کاهش تراکم استخوانی با انحراف معیار ۲/۵ زیر حد میانگین برای افراد بالغ سالم و جوان با جنس و نژاد یکسان تعریف می کند.^(۱)

می‌شود. ژنوتیپ‌های Apa1 : AA (عدم وجود جایگاه شناسایی آنزیم)، Aa (هتروزیگوت بودن جایگاه شناسایی آنزیم)، aa (وجود جایگاه شناسایی آنزیم) و ژنوتیپ‌های Taq1 : TT (عدم وجود جایگاه شناسایی آنزیم)، Tt (هتروزیگوت بودن جایگاه شناسایی آنزیم)، tt (وجود جایگاه شناسایی آنزیم).

مطالعه حاضر با هدف تعیین ارتباط بین پلی مورفیسم‌های Taq1 (rs1788009) و Apa1 (rs 17879735) ژن گیرنده ویتامین D با پوکی استخوان در خانم‌های یائسه انجام شد.

* مواد و روش‌ها:

در این مطالعه مورد-شاهدی در سال ۱۳۸۹ تعداد ۱۶۰ خانم یائسه انتخاب شدند. ۸۰ نفر از آن‌ها، بیماران مراجعه‌کننده به درمانگاه روماتولوژی بیمارستان بوعلی سینای قزوین و ۸۰ نفر از مراجعه‌کنندگان به سایر درمانگاه‌ها با شرایط عمومی و سنی یکسان بودند. این افراد پس از اعلام آمادگی و تکمیل برگه رضایت‌نامه وارد مطالعه شدند. بیماران با سابقه مصرف کورتن، برداشتن و نارسایی زودرس تخمدان، بیماری‌های تیروئید، اختلال‌های جذب کلسیم، بیماری‌های دستگاه گوارش و بیماری‌های کلیه CRF از مطالعه حذف شدند.

میزان تراکم استخوانی در مهره‌های کمری، گردن استخوان ران و استخوان‌های مچ دست این افراد با روش double-energy x-ray absorptiometry (DEXA) و با دستگاه Hologic QDR 2008 ساخت کشور آلمان تعیین و مقادیر با دو روش T. Score و Z. Score مشخص شدند. سپس به منظور بررسی ژنتیکی از آن‌ها ۵ سی‌سی خون کامل اخذ و در در لوله‌های حاوی ضد انعقاد EDTA جمع‌آوری گردید. این نمونه‌ها تا روز آزمایش در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

DNA ژنومی با استفاده از کیت High Pure PCR Template Preparation (شرکت Roche) از نمونه‌های خون جمع‌آوری شده استخراج گردید.

در ایالات متحده آمریکا، سالیانه ۱/۵ میلیون شکستگی استخوان به علت پوکی استخوان اتفاق می‌افتد که شکستگی استخوان ران به علت ۲۰ درصد مرگ و میر در سال اول بیش‌ترین اهمیت را دارد. بیش از ۵۰ درصد این بیماران نمی‌توانند به خوبی فعالیت‌های قبلی خود را باز یابند و ده درصد نیز به اقدام‌های درمانی طولانی مدت نیاز پیدا می‌کنند و میزان ترومبوز وریدهای عمقی بیماران (۲۰ تا ۵۰ درصد) بالاست.^(۱)

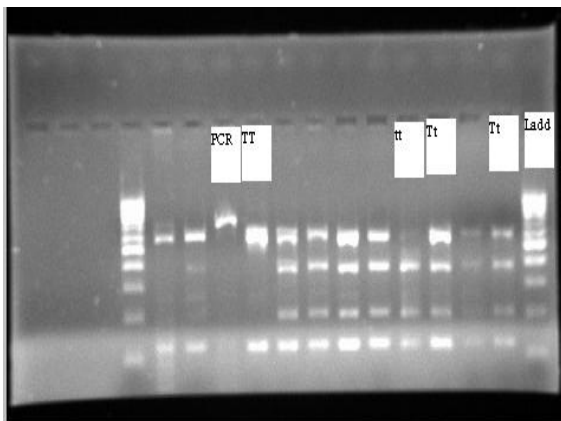
مطالعه‌های قبلی بر روی دو قلوها و خانواده‌های آن‌ها نشان داده است که وراثت در تشکیل توده استخوانی نقش مهمی دارد. در این مطالعه‌ها، توارث‌پذیری توده استخوانی (بین ۵۰ تا ۸۵ درصد) با بیش‌ترین تأثیر بر روی استخوان‌های محوری تخمین زده شد. همچنین این مطالعه‌ها نشان دادند که حدود ۲۷ تا ۶۸ درصد تفاوت در شکستگی‌های استئوپروتیک، ناشی از عوامل وراثتی است.^(۳-۶)

پوکی استخوان یک بیماری چند ژنی است که ژن‌های متعددی در آن مؤثرند و مهم‌ترین آن‌ها عبارتند از: ژن گیرنده ویتامین D، استروژن، کلاژن نوع ۱، عامل رشد شبه انسولین و اینترلوکین ۶.^(۷)

ژن گیرنده ویتامین D، اولین ژنی است که توسط محققین در ارتباط با پوکی استخوان بررسی شد. یک مطالعه نشان داد که تنوع در ژن گیرنده ویتامین D می‌تواند مسؤول ۷۵ درصد تفاوت‌های ژنتیک در توده استخوانی باشد. بیش‌ترین مطالعه بر روی چند پلی مورفیسم ناحیه ۳' این ژن توسط آنزیم‌های محدودکننده Apa1، Taq1 و Bsm1 انجام شده است.^(۸)

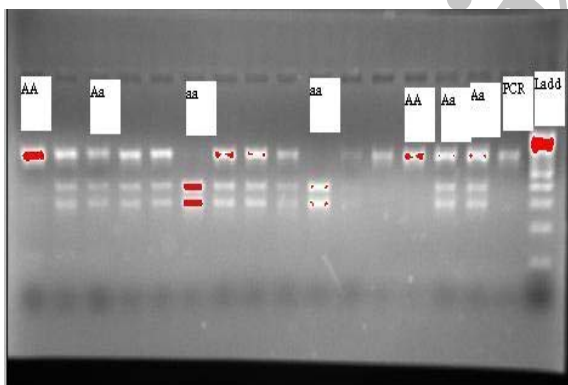
پلی مورفیسم یا چند شکلی، تغییر نوکلئوتید در توالی ژن هاست که به بیماری خاصی منجر نمی‌شود و فراوانی بیش‌تر از یک درصد در جوامع را دارد. در واقع این پلی مورفیسم‌ها می‌توانند جایگاه شناسایی یک آنزیم را ایجاد کنند یا از بین ببرند و ژنوتیپ‌های متفاوتی به وجود آورند. در ژن گیرنده ویتامین D توانایی ایجاد برش توسط آنزیم Apa1 و Taq1 موجب پدید آوردن ژنوتیپ‌های زیر

وجود جایگاه شناسایی آنزیم، قطعه‌هایی با طول ۵۲۳ bp و ۱۷۸ bp تولید می‌کرد (شکل شماره ۱).



شکل ۱- نتیجه الکتروفورز محصولات به دست آمده از هضم آنزیم محدودگر Taq1 روی ژل آگاروز ۲٪

طول قطعه تکثیر شده در Apa1 نیز ۷۰۱ bp بود که پس از هضم با آنزیم Apa1، در صورت وجود جایگاه شناسایی آنزیم، قطعه‌هایی با طول ۲۴۶ bp و ۴۵۵ bp تولید می‌کرد (شکل شماره ۲).



شکل ۲- نتیجه الکتروفورز محصولات به دست آمده از هضم آنزیم محدودگر Apa1 روی ژل آگاروز ۲٪

توزیع فراوانی ژنوتیپ Taq1 به ترتیب شیوع شامل ۹۶ نفر (۶۰ درصد) Tt، ۴۸ نفر (۳۰ درصد) TT و ۱۶ نفر (۱۰ درصد) tt بود. بین میزان تراکم استخوان مهره‌های کمر به روش T.Score و ژنوتیپ‌های مختلف Taq1

پلی مورفیسم‌های ژن گیرنده ویتامین D، Apa1 و Taq1 با استفاده از پرایمرهای طراحی شده توسط نرم‌افزار Primer 3 و روش PCR تکثیر شد.

Apa1-F: 5' AGCAGAGCAGAGTTCCAAGC-3'
 Apa1-R: 5' GTGAGGAGGGCTGCTGAGTA-3'
 Taq1-F: 5' AGCAGAGCAGAGTTCCAAGC-3'
 Taq1-R: 5' GTGAGGAGGGCTGCTGAGTA-3'

مواد واکنش عبارت بودند از: ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰x، یک میکرولیتر 50mM MgCl2، یک میکرولیتر پرایمر فوروارد 10pmol/ml، یک میکرولیتر پرایمر ریورس 10pmol/ml، ۰/۵ میکرولیتر 10mM dNTP Mix، ۰/۳ میکرولیتر 5u/ml Taq Polymerase، ۵ میکرولیتر DNA الگو و ddH2O به اندازه‌ای که حجم واکنش به ۲۵ میکرولیتر برسد.

واکنش‌های PCR با شرایط حرارتی زیر برای هر دو ژن Aqa و Taq انجام شد: ۵ دقیقه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به عنوان مرحله واسرشت اولیه و سپس ۳۰ ثانیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه ۵۸ درجه سانتی‌گراد به عنوان مرحله اتصال، ۳۰ ثانیه ۷۲ درجه سانتی‌گراد به عنوان مرحله تکثیر به تعداد ۳۵ دور و در نهایت ۵ دقیقه ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای تکثیر نهایی در دستگاه ترموسایکلر مدل Verit (شرکت ABI). بعد از تکثیر، قطعه‌ها توسط آنزیم‌های محدودکننده Apa1 و Taq1 (شرکت Fermentas UK) هضم شدند. ترکیب واکنش عبارت بود از: ۱۷ میکرولیتر Nuclease free water، ۲ میکرولیتر 10x Fast digest green buffer، یک میکرولیتر DNA و یک میکرولیتر از آنزیم‌های Apa1 و Taq1 بود. سپس واکنش‌های هر دو آنزیم طبق دستور ارایه شده شرکت مذکور گرمخانه گذاری گردیدند. محصول‌های به دست آمده بر روی ژل آگاروز ۲ درصد بررسی و ژنوتیپ‌های Apa1 و Taq1 تعیین شدند. داده‌ها با آزمون‌های آماری مجذور کای و آنوا تحلیل شدند.

* یافته‌ها:

طول قطعه تکثیر شده در پلی مورفیسم Taq1 حدود ۷۰۱ bp بود که پس از هضم با آنزیم Taq1، در صورت

جدول ۲- مقایسه تراکم استخوان مهره‌های کمری،
گردن استخوان ران و میچ دست در ژنوتیپ‌های مختلف
Apa1

سطح معنی‌داری	aa (نفر ۱۵)	Aa (نفر ۹۴)	AA (نفر ۵۱)	ژنوتیپ‌های Mحل تراکم استخوان Apa1
۰/۶۴۲	-۰/۵۱±۱/۰۹	-۰/۸۹±۱/۴۱	-۰/۷۹±۱/۶۲	مهره‌های کمری (T.Score)
۰/۴۶۴	۰/۴۲۶±۱/۳	۰/۰۰۹±۱/۳۲	-۰/۰۴۳±۱/۳۷	مهره‌های کمری (Z.Score)
۰/۷۳۷	-۰/۶۴±۱	۰/۶۸±۱/۷	-۰/۴۸±۱/۲۴	گردن ران (T.Score)
۰/۸۵۵	۰/۶±۷۵	۰/۲۲±۱/۱	۰/۲۳±۱/۲۲	گردن ران (Z.Score)
۰/۳۷۵	-۱/۰۱±۱/۴۳	-۰/۹۷±۱/۵۳	-۰/۶۱±۱/۵۹	میچ دست (T.Score)
۰/۲۶۷	-۰/۲۶±۱/۳۴	-۰/۲۳±۱/۱۹	-۰/۰۹۴±۱/۲	میچ دست (Z.Score)

* بحث و نتیجه‌گیری:

این مطالعه نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین پلی مورفیسم‌های مختلف Apa1 و Taq1 با پوکی استخوان وجود ندارد. زنگ و همکاران هم ارتباط معنی‌داری بین پلی مورفیسم‌های مختلف ژن‌های ویتامین D (Bsm1, Taq1, Fok1, Apa1) با تراکم استخوان در دوران پس از یائسگی مشاهده نکردند.^(۹) همچنین در مطالعه کوپین و همکاران در چین در مورد ارتباط بین پلی مورفیسم‌های مختلف ژن Apa1 و گیرنده α استروژن با مقدار تراکم استخوان خانم‌های یائسه، هیچ‌گونه ارتباط منطقی بین پلی مورفیسم‌های Apa1 و تراکم استخوان و مهره‌های کمری و استخوان ران مشاهده نشد.^(۱۰)

از سویی دیگر، داندار و همکاران در ترکیه با مطالعه بر روی ۱۳۶ خانم یائسه نشان دادند که افراد با ژنوتیپ aa نسبت به AA مقادیر تراکم استخوان پایین‌تری در استخوان کمر و همچنین سطح کلسیم بالاتری در ژنوتیپ AA در مقایسه با aa داشتند. به عقیده آن‌ها پلی مورفیسم ژن Apa1 نقش مهمی در تراکم استخوان در مهره‌های کمر زنان یائسه دارد.^(۱۱)

ارتباط معنی‌دار آماری وجود داشت؛ بدین معنی که افراد با ژنوتیپ tt در مقایسه با Tt تراکم استخوان پایین‌تری داشتند. ولی در روش Z.Score این ارتباط معنی‌دار نبود. همچنین ارتباط آماری معنی‌داری بین تراکم استخوان گردن ران و ژنوتیپ‌های مختلف Taq1 به روش T.Score وجود داشت؛ یعنی افراد دارای ژنوتیپ TT نسبت به Tt، تراکم استخوان کم‌تری داشتند. با روش Z.Score ارتباط آماری معنی‌داری بین تراکم استخوان میچ دست با دو ژنوتیپ tt و Tt به دست آمد؛ یعنی افراد با ژنوتیپ tt، تراکم استخوان کم‌تری نسبت به Tt داشتند (جدول شماره ۱).

جدول ۱- مقایسه تراکم استخوان مهره‌های کمری،
گردن استخوان ران و میچ دست در ژنوتیپ‌های مختلف
Taq1

سطح معنی‌داری	Tt (نفر ۱۶)	Tt (نفر ۹۶)	TT (نفر ۴۸)	ژنوتیپ‌های Mحل تراکم استخوان Taq1
۰/۰۲	-۱/۴۸±۱/۸۶	-۰/۵۷±۱/۲۷	-۱/۰۹±۱/۵۵	مهره‌های کمری (T.Score)
۰/۳۶۹	-۰/۲۷±۱/۳۶	۰/۱۳±۱/۲۳	-۰/۱۱±۱/۵۵	مهره‌های کمری (Z.Score)
۰/۰۱۳	-۰/۶±۱/۴۴	-۰/۳۵±۱/۱۴	-۱/۱۴±۲	گردن ران (T.Score)
۰/۲۱۹	۰/۱±۰/۸۴	۰/۳۲±۱/۱	۰/۰۱۲±۱	گردن ران (Z.Score)
۰/۰۵۳	-۱/۴۶±۲/۲۴	-۰/۶۳±۱/۱۶	-۱/۱۲±۱/۸۴	میچ دست (T.Score)
۰/۰۱	-۰/۶۵±۱/۲۳	-۰/۰۹±۱/۰۸	-۰/۴۲±۱/۴۳	میچ دست (Z.Score)

توزیع فراوانی ژنوتیپ‌های Apa1 به ترتیب شیوع شامل ۹۴ نفر (۵۸/۷ درصد) Aa، ۵۱ نفر (۳۱/۹ درصد) AA و ۱۵ نفر (۹/۴ درصد) aa بود و بین تراکم‌سنجی استخوان و این ژنوتیپ‌ها ارتباط آماری معنی‌داری با هر دو روش T.Score و Z.Score وجود نداشت (جدول شماره ۲).

- longitudinal study in aging male twins. *Am J Hum Genet* 1989 Mar; 44 (3): 429-33
5. Slemenda CW, Christian JC, Williams CJ, et al. Genetic determinants of bone mass in adult women: a reevaluation of the twin model and the potential importance of gene interaction on heritability estimates. *J Bone Miner Res* 1991 Jun; 6 (6): 561-7
6. Flicker L, Hopper JL, Rodgers L, et al. Bone density determinants in elderly women: a twin study. *J Bone Miner Res* 1995 Nov; 10 (11): 1607-13
7. Arai H, Miyamoto K, Taketani Y, et al. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *J Bone Miner Res* 1997 Jun; 12 (6): 915-21
8. Ralston SH, Crombrughe B. Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis. *Genes Dev* 2006 Sep 15; 20 (18): 2492-506
9. Zhang ZL, Zhao JX, Meng XW, et al. Association of polymorphisms of vitamin D receptor gene start codon and 3'-end region with bone mineral density in postmenopausal women. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2003 Feb; 20 (1): 5-8
10. Qin YJ, Zhang ZL, Huang QR, et al. Association of vitamin D receptor and estrogen receptor-alpha gene polymorphism with peak bone mass and bone size in Chinese women. *Acta Pharmacol Sin* 2004 Apr; 25 (4): 462-8
11. Dunder U, Solak M, Kavuncu V, et al. Evidence of association of vitamin D receptor Apa I gene polymorphism with bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *Clin Rheumatol* 2009 Oct; 28 (10): 1187-91
12. Mitra S, Desai M, Ikram Khatkhatay M.

مطالعه ماتریس و همکاران در مورد ارتباط بین پلی مورفیسیم‌های ژن گیرنده ویتامین D (Apa1, Taq1, fok1, BSml1) با میزان تراکم استخوان زنان یائسه هندی با متوسط سنی $54/2 \pm 3/4$ سال نشان داد که افراد با ژنوتیپ‌های TT, FF, bb, aa نسبت به تراکم استخوان بیش‌تری داشتند.^(۱۲)

در مطالعه حاضر، ارتباط معنی‌داری بین پلی مورفیسیم‌های مختلف ژن گیرنده ویتامین D با میزان تراکم استخوان مشاهده نشد. ولی افراد با ژنوتیپ tt در مقایسه با Tt تراکم استخوان پایین‌تری در مهره‌های کمری داشتند و موارد با ژنوتیپ TT تراکم استخوان پایین‌تری نسبت به Tt در گردن استخوان ران داشتند. البته ممکن است در صورت بررسی با حجم نمونه بالاتر یا بررسی دیگر عوامل دخیل در میزان تراکم استخوان، نتایج متفاوتی به دست آید. بنابراین با توجه به نتایج مطالعه حاضر و مطالعه‌های قبلی، می‌توان گفت که ارتباط بین پلی مورفیسیم‌های ژن گیرنده ویتامین D و میزان تراکم استخوان هنوز به نتیجه قطعی نرسیده است و به بررسی‌های گسترده‌تری در آینده نیاز دارد.

* مراجع:

1. Lindsay R, Cosman F. Osteoporosis. In: Harrison's principles of internal medicine. 17th ed. MacGraw-Hill; 2008. 2397-408
2. Prince RL, Dick I. Oestrogen effects on calcium membrane transport: a new view of the inter-relationship between oestrogen deficiency and age-related osteoporosis. *Osteoporos Int* 1997; 7 Suppl 3: S150-4
3. Pocock NA, Eisman JA, Hopper JL, et al. Genetic determinants of bone mass in adults: a twin study. *J Clin Invest* 1987 Sep; 80 (3): 706-10
4. Christian JC, Yu PL, Slemenda CW, Johnston CC Jr. Heritability of bone mass: a

Vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density in postmenopausal Indian women. *Maturitas* 2006 Aug 20; 55 (1): 27-35

Archive of SID