بررسی پلی مورفیسم‌های rs7041 و rs4588 ژن کدکننده پروتئین متصل شونده به ویتامین D (VDBP) در خانم‌های یائسه مبتلا به پوکی استخوان

معصوم نیکزاد هرسینی: کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی مولکولی گرایش ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران massom.nikzad@yahoo.com
احسان صبوری: دانشجوی دکتری تخصصی پزشکی مولکولی، گروه پزشکی مولکولی و ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران . ehsansaburi@yahoo.com
*__ساناز مهمازی__: استادیار ژنتیک مولکولی، گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران (*نویسنده مسئول). sanazmahmazi@yahoo.com
امیرحسین تارمچی: استادیار زیست فناوری پزشکی، گروه بیوتکنولوژی و نانوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران. taromchei@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۷/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: پوکی استخوان، بیماری چند عاملی است که با کاهش تراکم مواد معدنی استخوان (BMD) بخصوص کلسیم و افزایش احتمال شکستگی استخوان همراه است. پروتئین ناقل ویتامین D (VDBP=Gc) مولکولی کلیدی در ایفا نقش بیولوژیک ویتامین D می‌باشد. جهش در برخی مناطق حیاتی این پروتئین می‌تواند متابولیسم مواد معدنی بخصوص کلسیم را که در تراکم استخوان نقش دارد تحت تاثیر قرار دهد. این مطالعه حاضر با هدف بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم های rs7041 (HaeIII) و rs4588 (StyI) ژن پروتئین ناقل ویتامین D با پوکی استخوان در خانم‌های یائسه نژاد آذری استان زنجان انجام پذیرفته است.

روش کار: این مطالعه مورد شاهدی، خون محیطی از ۵۰ زن آذری مونوپوز مبتلا به پوکی استخوان و ۵۰ زن آذری مونوپوز سالم به جهت استخراج DNA جمع‌آوری شد. پلی مورفیسم های rs7041 و rs4588 پروتئین VDBP به روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت. تحلیل آماری بر مبنای نرم افزار SPSS نسخه ۱۴ و به‌وسیله آزمون های آماری t-indipendent، کای دو انجام پذیرفت.

یافته‌ها: تفاوت معناداری بین پلی مورفیسم های rs7041 و rs4588 و سه هاپلوتایپ (Gc1s، Gc2، Gc1f) با پوکی استخوان مشاهده نشد (p>۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: با اینکه نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ژنوتایپ های مختلف ژن VDBP در افزایش شانس رخداد پوکی استخوان در زنان مبتلا به استئوپروز نقش ندارد، لیکن با توجه به نتایج بعضاً مشابه و یا متناقض با دیگر مطالعات در برخی نژادهای دیگر کشورها، به نظر می رسد انجام مطالعه با تعداد نمونه بیشتر و یا در نژادهای دیگر ایرانی ممکن است نتایج معناداری را در پی داشته باشد.

کلیدواژه‌ها: پوکی استخوان، پروتئین ناقل ویتامین D، پلی مورفیسم، مونوپوز

مقدمه

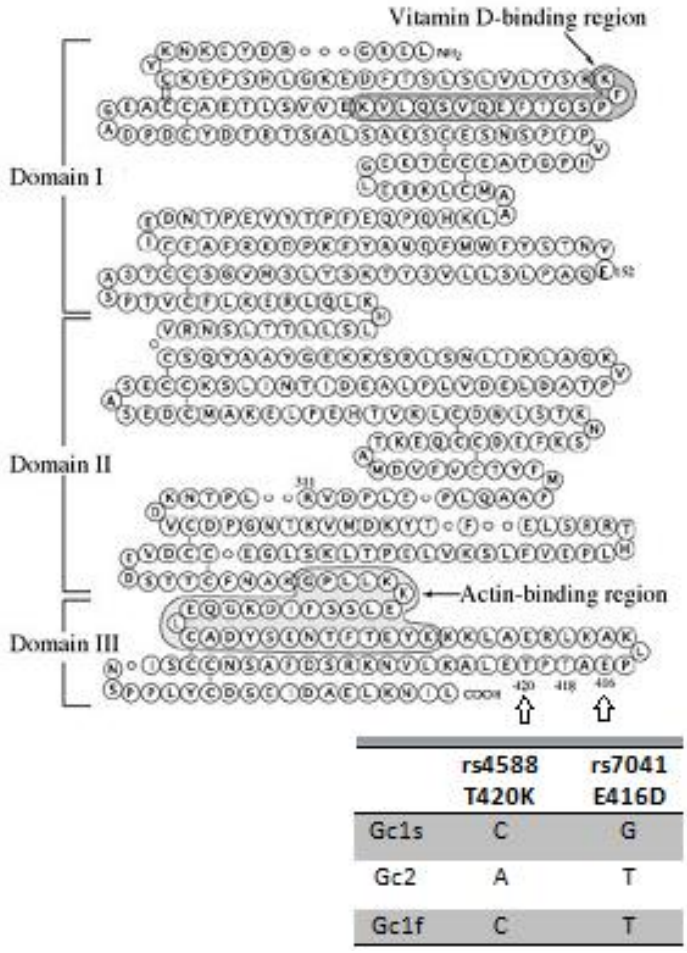
کاهش تراکم استخوان با انحراف معیار ۲/۵ کمتر از حد میانگین برای افراد بالغ سالم و جوان با جنس و نژاد یکسان را اصطلاحاً پوکی استخوان (Osteoprosis) می‌نامند (۱) که با شکستگی‌های تکرارشونده در مهره‌ها، گردن ران و مچ دست ظهور می‌یابد (۲). کمبود متابولیت‌های مؤثر در متابولیسم استخوان (۳)، عوامل ژنتیکی و نژاد (۴)، مصرف برخی داروها (۳، ۵)، سبک زندگی نامناسب، مصرف الکل و سیگار (۶، ۷)، کم‌تحرکی و برخی بیماری‌های زمینه‌ای نظیر بیماری‌های مزمن کبد و کلیه، دیابت نوع ۱، افزایش هورمون تیروئید و پاراتیروئید، اختلالات هورمون‌های جنسی، اسهال مزمن و اختلالات سوء جذب، بی‌اشتهایی عصبی، پیوند اعضا و برخی سرطان‌ها باعث افزایش احتمال ابتلا به پوکی استخوان می‌شوند (۸).

پوکی استخوان در خانم‌های یائسه شیوع بالایی (نزدیک به ۵۰٪) دارد (۷، ۹) که فراوانی آن بین کشورها و حتی در بین مناطق و نژادهای مختلف

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-12]

یک کشور نیز متفاوت است (۱۰، ۱۱). پوکی استخوان یک بیماری چندعاملی است و نقش ژنتیک در بروز آن انکارناپذیر است. اختلال در ژن‌های متعددی در رخداد آن مؤثرند که مهم‌ترین آن‌ها عبارت‌اند از: استروژن، کلاژن نوع I ، عامل رشد شبه انسولین و اینترلوکین ۶، ژن گیرنده ویتامین D (VDR) و ژن ناقل ویتامین D (VDBP) (۱۲، ۱۳).

ویتامین D علاوه بر اینکه به‌عنوان یک متابولیت مهم در متابولیسم استخوان مطرح می‌باشد لیکن نقش مهمی در تنظیم بیان برخی ژن‌های مهم ایفا می‌کند. ژن‌های مؤثر در متابولیسم آن نیز علاوه بر نقش اصلی خود در تعیین بسیاری از عملکردهای مهم بدن نقش ایفا می‌کنند (۱۴). پروتئین ناقل ویتامین D (Vitamin D Binding Protein) که در سرم به ویتامین D متصل شده و علاوه بر جابجایی، نقش ذخیره ویتامین D را ایفا می‌کند. پروتئین ناقل ویتامین D، از خانواده آلبومین می‌باشد و Gc نیز نامیده می‌شد، علاوه بر انتقال و ذخیره ویتامین D، عملکردهای فیزیولوژیک مهمی شامل مهار و به دام انداختن G- اکتین خارج سلولی، افزایش فعالیت کموتاکسی C5α در التهاب نوتروفیلی و فعالیت ماکروفاژی نقش دارد (۱۵-۱۷). پروتئین Gc یک گلیکوپروتئین پلی مورفیک (چند شکلی) بسیار شبیه آلبومین سرم است و از سه دومین شامل دومین I متصل شونده به ویتامین D، دومین III سایت گلیکوزیلاسیون و دومین II رابط بین دمین I و III تشکیل می‌شود. دومین III در قسمت C- ترمینال خود شامل توالی شش اسیدآمینه‌ای که محل اتصال اکتین می‌باشد و همچنین حامل یک سایت گلیکوزیلاسیون GalNAc (N-



شکل ۱- ساختار ثانویه پروتئین ناقل ویتامین D به همراه ژنوتیپ و الل‌های rs4588 و rs7041 اگزون شماره ۱۱ ژن کد کننده پروتئین Gc (۲۱)

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-12]

acetylgalactosaminidase) در مجاورت اسید آمینه ۴۲۰- ۴۱۸ که در فعال‌سازی آبشاری ماکروفاژ نقش دارد (۱۸). ژن Gc روی کروموزوم شماره ۴ کدگذاری شده و دارای سه آلل متداول (Gc1s, Gc1f و Gc2) و بیش از ۱۲۰ واریانت می‌باشد (۱۹) (شکل ۱). در نتیجه تغییر نوکلئوتیدی در پلی مورفیسم‌های rs7041 (E416D) و rs4588 (T420K) اگزون ۱۱ سبب ایجاد سه هاپلوتایپ متفاوت از پروتئین ناقل ویتامین D می‌گردد (۲۰). در جایگاه پلی مورفیک rs7041 توانایی برش توسط آنزیم محدودکننده HaeIII وجود دارد که در صورت جایگزینی نوکلئوتید G (هاپلوتایپ Gc1s) با T (هاپلوتایپ‌های Gc1f و Gc2) این جایگاه برش از دست می‌رود. همچنین در جایگاه پلی مورفیک rs4588 توانایی ایجاد برش توسط آنزیم StyI در وجود نوکلئوتید C (Gc1f و Gc1s) و نه A (Gc2) موجب تمایز هاپلوتایپ‌های مذکور می‌گردد. با توجه به رخداد پلی مورفیسم‌های مذکور، اسیدآمینه‌های گلوتامات در هاپلوتایپ Gc1s و آسپارتات در هاپلوتایپ‌های Gc2 و Gc1f در جایگاه ۴۱۶ و اسید آمینه ترئونین در هاپلوتایپ‌های Gc1 و لایزین در هاپلوتایپ Gc2 دومین سوم نزدیک محل اتصال اکتین قابل پیش بینی است.

ارتباط بین پلی مورفیسم‌های ژن VDBP با بیماری‌های مختلف ازجمله COPD، دیابت، سرطان و اختلالات کلیوی مورد بررسی قرار گرفته است، لیکن ارتباطات متفاوت و بعضاً متناقضی بین تغییرات ژنومی مذکور و بیماری‌هایی چون اختلالات ریوی، اختلالات کلیوی، اختلالات استخوان و مفاصل، بیماری‌های عفونی و ... به اثبات رسیده است (۱۳، ۲۲-۲۵). با در نظر گرفتن همین تناقضات و توجه به انجام مطالعات معدود بررسی ژنوتایپ های مذکور و پوکی استخوان در جهان و بخصوص ایران و با توجه به این مسئله که عملکرد این پروتئین ارتباط مستقیمی با مقدار ویتامین D فعال جابجا شده و جذب توسط سلول‌ها بخصوص استئوکلاست‌ها و استئوبلاست‌ها دارد، این مطالعه به‌منظور یافتن ارتباط بین پلی مورفیسم‌های rs7041 و rs4588 اگزون ۱۱ ژن پروتئین ناقل ویتامین D با رخداد پوکی استخوان در زنان یائسه مبتلا به استئوپروز شهر زنجان انجام پذیرفته است.

روش کار

این مطالعه مورد-شاهدی بروی زنان نژاد آذری مراجعه‌کننده به بیمارستان‌ها و مراکز بهداشتی درمانی شهر زنجان، طی سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۴ انجام پذیرفت. از تعداد ۵۰ زن یائسه مبتلا به پوکی استخوان و ۵۰ زن یائسه غیر مبتلا به پوکی استخوان که صحت ابتلا یا عدم ابتلا در آن‌ها به روش DEXA (Double-Energy X-ray Absorptiomtery) در مهره‌های کمری، گردن ران و مچ دست به دو روش T-Score و Z-Score تایید شده بود، پس از اخذ رضایت نامه و کسب اطلاعات دموگرافیک از طریق مصاحبه چهره به چهره و پرسشنامه، اقدام به نمونه‌گیری ۲ سی‌سی خون محیطی شد. معیارهای خروج بیماران از روند مطالعه استفاده مکرر از کورتون، نارسایی و یا برداشتن تخمدان، بیماری‌های تیروئید، اختلال جذب کلسیم، بیماری‌های جذب گوارشی، بیماری‌های کلیوی مزمن، مصرف مکرر مکمل‌های کلسیمی و مصرف مواد مخدر بوده است. گروه کنترل از بین مراجعین یائسه فاقد معیارهای پوکی استخوان انتخاب و با گروه هدف از نظر میانگین سنی همسان گردیدند. توسط کیت تجاری DNP™ شرکت سیناکلون از نمونه‌های جمع‌آوری‌شده DNA استخراج شد.

پرایمرهای مورد استفاده در روش تکثیر ژنی F:5′-CTGGCAGAGCGACTAAAAGC-3′ و R:5’-AGCAGTTGGAGGCAAAGTCT-3′ بوده است که قطعه به طول ۴۹۰ جفت باز را تولید می‌نماید. واکنش‌های PCR با شرایط حرارتی: ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۸ سیکل تکثیری ۳۰ ثانیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌منظور واسرشت، ۳۰ ثانیه ۶۱ درجه سانتی‌گراد به‌عنوان مرحله اتصال پرایمرها و ۳۰ ثانیه ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌منظور همانندسازی الگوها و در نهایت ۱۰ دقیقه ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-12]

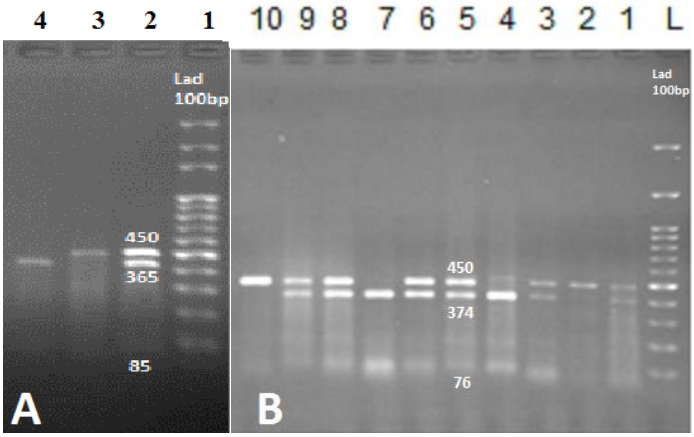
پذیرفت. مواد مورد استفاده در واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر عبارت بودند از: ۲/۵ میکرولیتر بافر X10، ۰/۵ میکرولیتر (5u/µl) آنزیم Taq Polymerase، یک میکرولیتر $MgCl_2$ (50mM)، ۰/۵ میکرولیتر (10mM) dNTP Mix، ۵ میکرولیتر DNA الگو و ۱۳/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه استریل به همراه یک میکرولیتر (10pmol/ml) از مخلوط پرایمر های مستقیم و معکوس (GeneAll-Canada).

صحت محصولات PCR با الکتروفورز بروی ژل آگاروز ۱/۵٪ بررسی شد و هضم آنزیمی با آنزیم‌های StyI و HaeIII (Thermoscientific) صورت گرفت. محصول ۴۵۰ جفت بازی PCR در اثر برش آنزیم HaeIII (BsuRI) به دو قطعه ۳۶۵ و ۸۵ جفت بازی و توسط آنزیم StyI (Eco130I) به دو قطعه ۳۷۴ و ۷۶ بریده می‌شود. آنزیم HaeIII، در ژنوتیپ‌های TT به دلیل عدم وجود جایگاه شناسایی قطعه ۴۵۰ جفت بازی برش نخورده داشته و هتروزیگوت‌های TG قطعات ۴۵۰، ۳۶۵ و ۸۵ جفت بازی و هموزیگوت‌های GG قطعات ۳۶۵ و ۸۵ جفت بازی را حاصل نمودند. در ژنوتایپینگ StyI وجود الل C با ایجاد جایگاه شناسایی آنزیم در افراد هموزیگوت CC قطعات ۳۷۴ و ۷۶ جفت بازی حاصل شد و هتروزیگوت‌های CA قطعات ۴۵۰، ۳۷۴ و ۷۶ جفت بازی داشتند و با توجه به عدم برش آنزیمی هموزیگوت‌های AA قطعه برش نخورده ۴۵۰ جفت بازی داشتند (شکل ۲). تجزیه و تحلیل آماری بر مبنای نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۴ انجام و به‌وسیله آزمون‌های آماری X^2 و بررسی خطر نسبی (OR) در سطح معناداری $p<$ ۰/۰۵ محاسبه گردید.

یافته‌ها

از تعداد ۵۰ زن یائسه مبتلا به استئوپروز با میانگین سنی ۶۸/۷۲ (بازه سنی ۸۸-۵۶) و ۵۰ زن یائسه غیر مبتلا به استئوپروز با میانگین سنی ۶۴/۷ (بازه سنی ۸۱-۵۱) که در بررسی چولگی توزیع سنی با استفاده از آماره‌های Skewness-Kurtosis توزیع متقارن بدست آمد. همچنین در بررسی نرمالیتی توزیع با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk، توزیع سنی (p=۰/۰۵۵) نرمال ارزیابی شد.

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، تفاوت معناداری بین فراوانی فنوتایپ های مختلف پروتئین Gc بین دو گروه کنترل و بیماران مبتلا به استئوپورز مشاهده نشد (p=۰/۴۹۲). همچنین آنالیز داده‌ها نشان داد که بین فنوتایپ های مختلف Gc و سن ابتلا به بیماری تفاوت معناداری وجود ندارد (p=۰/۹۵). معناداری نتایج بدست آمده با استفاده از آزمون آماری Chi-Square نیز انجام شد تا میزان ارتباط بین پوکی استخوان و هر یک از ژنوتایپ ها با مقایسه بین دو گروه بیمار و کنترل بدست آید. این آزمون نیز مشابه با آزمون



شکل ۲- الگوی برش با آنزیم های HaeIII (تصویر A) و StyI (تصویر B) در تعدادی از نمونه‌های مطالعه بر روی ژل آگارز

در تصویر A، ردیف ۱ Ladder100bp، ردیف ۲ الی ۴ به ترتیب ژنوتایپ TG، TT و GG را نشان می دهد. در تصویر B؛ ردیف L نشانگر Ladder 100bp و ردیف ۱، ۳، ۵، ۶، ۸ و ۹ ژنوتایپ CA و ردیف ۲ و ۱۰ ژنوتایپ AA و ردیف ۴ و ۷ ژنوتایپ CC را نشان می دهد.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-12]

جدول ۱- شیوع تفکیکی ژنوتایپ های ژن ناقل ویتامین D در بیماران در مقایسه با گروه کنترل

ژنوتایپ (٪)	بیمار	کنترل	کل	OR (95% CI)
1S/1S	۲۱ (٪۴۲)	۱۸ (٪۳۶)	۳۹ (٪۷۸)	۱
1S/1F	۱۷ (٪۳۴)	۱۵ (٪۳۰)	۳۲ (٪۶۴)	۰/۹۷ (۰/۳۸-۲/۴۸)
1S/2	۸ (٪۱۶)	۱۵ (٪۳۰)	۲۳ (٪۴۶)	۰/۴۵ (۰/۱۵-۱/۳۲)
1F/1F	۳ (٪۶)	۱ (٪۲)	۴ (٪۸)	۲/۵ (۰/۲۴-۲۶/۹۳)
2/2	۱ (٪۲)	۱ (٪۲)	۲ (٪۴)	۰/۸۵ (۰/۰۵-۱۴/۷)

فیشر بوده و سطح معناداری کمتر از ۰/۰۵ به‌عنوان سطح معناداری تلقی گردید. همچنین خطر نسبی (OR) معناداری بین ژنوتایپ‌های مختلف از پروتئین Gc با رخداد بیماری مشاهده نگردید. همچنین هیچ‌کدام از ژنوتایپ ها نسبت به یکدیگر به جهت محافظت در برابر رخداد پوکی استخوان دارای مزیت نبودند (p >۰/۰۵).

در مجموع ۱۰۰ فرد مورد نمونه‌گیری (۵۰ بیمار و ۵۰ کنترل)، هاپلوتایپ Gc1S با شیوع ٪۶۶ بیشترین شیوع و ژنوتایپ Gc2 با شیوع ٪۱۳/۵ از کمترین شیوع برخوردار بود. هیچ ارتباط معناداری بین هاپلوتایپ ها و دیپلوتایپ ها با رخداد و یا سن بیماری دیده شد (جدول ۱). همچنین نتایج از طریق آزمون دقیق فیشر نیز بررسی گردید و P=۰/۳۷۱ به دست آمد. در واقع نتایج نشان می‌دهد با توجه به تعداد نمونه در دسترس، در این مطالعه استقلال بین ابتلا به پوکی استخوان و ژنوتایپ‌های مختلف رد نمی‌شود و نمی توانیم وجود ارتباط را تایید نماییم.

بحث و نتیجه‌گیری

با اینکه شناخت توالی، ساختار و عملکرد پروتئین ناقل ویتامین D به اواخر دهه ۸۰ میلادی باز می‌گردد، لیکن توجه به آن در سالهای اخیر شدت یافته است. تاکنون مطالعات مختلفی برروی نقش پلی مورفیسم‌های مختلف این ژن در رخداد بیماری‌های مختلف ازجمله انواع سرطان، اختلالات ریوی، اختلالات خود ایمنی و... انجام شده است ولی مطالعات پیرامون ارتباط پلی مورفیسم‌های rs7041 و rs4588 در رخداد پوکی استخوان کمتر پرداخته شده است.

مطالعات معدودی که پیرامون ارتباط ژنوتایپ‌های پروتئین ناقل ویتامین D و اختلالات استخوانی انجام پذیرفته است معمولا نتایج یکسانی را نشان نمی دهد. با توجه به توانایی پروتئین متصل به ویتامین D در تحریک فعالسازی ماکروفاژها و نقش واسطه ای در بازجذب کلسیم توسط استخوانها با فعالسازی مستقیم استئوکلاست‌ها، مطالعات محدودی در گذشته انجام پذیرفته است. بررسی ژن‌های مرتبط به متابولیسم کلسیم و ویتامین D در زنان یائسه مبتلا به پوکی استخوان روس، نشان از ارتباط معنادار بین رخداد پوکی استخوان و ژنوتایپ‌های ژن ناقل ویتامین D بود (۲۶) که ممکن است با توجه به تفاوت زیاد نژادی بین دو نژاد قابل تفسیر باشد. بررسی ارتباط بین ژنوتیپ پروتئین Gc و پوکی استخوان در جامعه عظیم آماری کوهورت آمستردام (۷۹۸۳ زن و مرد سفید پوست) نیز نشان داد که ارتباط معناداری بین هاپلوتایپ‌های مختلف و رخداد شکستگی وجود ندارد. لیکن هاپلوتایپ Gc1s با بیشترین غلظت ویتامین D در سرم همراه بوده و البته بیشترین شیوع را در مقایسه با دیگر هاپلوتایپ ها دارد و کمترین میزان غلظت فرم فعال سرمی ویتامین D در افراد واجد هاپلوتایپ Gc2 می‌باشد که یافته های مرتبط با بیماری‌های دیگر را تایید می‌کند (۲۷). این در حالی است که در مطالعه ای در تایلند ارتباط معناداری در کاهش تیتر سرمی ویتامین D و ژنوتایپ های Gc1 دیده شد (۲۸). لیکن گروهی دیگر از محققین در مطالعه ای که بروی افراد اردنی انجام دادند به ارتباط معناداری بین برخی هاپلوتایپ های Gc1s و میزان بالای ویتامین D سرمی رسیدند (۲۹). Lauridsen و همکارانش فنوتایپ های Gc1-1، Gc1-2 و Gc2-2 را در ارتباط با خطر شکستگی استخوان در زنان یائسه مبتلا به پوکی استخوان نشان دادند که البته از آن

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-12]

بین فنوتایپ Gc2–2 کمترین ارتباط را دارا بود که با توجه به بیشترین توان آزادسازی ویتامین D توسط این فنوتایپ می‌توان یافته های فوق را توجیه نمود (۳۰). همین یافته ها در مطالعه دیگری که بروی زنان با یائسگی پیش از موعد انجام پذیرفت مشاهده گردید (۳۱). البته در مطالعه دیگری که بروی ۱۳ SNP در اگزون های مختلف ژن مذکور در زنان یائسه ژاپنی انجام شده، فقط دو پلی مورفیسم rs2298849 و rs7041 ونه rs4588 را در ارتباط با کاهش BMD یافتند. هر چند که همزمانی رخداد پلی مورفیسم‌های rs7041 و rs4588 در افراد مبتلا به پوکی استخوان بیشتر بود (۳۲).

دلیل این تضادها را می توان با در نظر داشتن اینکه فقط ۱۵٪ از ویتامین D موجود در سرم فرد به صورت آزاد و عملکردی است و مابقی بصورت ترکیب با پروتئین Gc می‌باشد (۲۷) توجیه نمود. همچنین نقش محتمل تاثیر هاپلوتایپ ها بر هم را نیز باستی در نظر داشت، بطوری که ممکن است هاپلوتایپ های مختلف به علت حضور هاپلوتایپ مشابه یا متفاوت قابلیت های رهاسازی یا اتصال خود به ویتامین D را تقویت نموده و ماهیت متفاوتی را نشان دهد. نقشی که Nagasawa و همکارانش در بررسی فعالیت فنوتایپ های مختلف پروتئین ناقل ویتامین D و اثر آنابولیکی آن بر استخوان مانند افزایش تراکم استخوان و افزایش قدرت استخوان سازی با واسطه تاثیر بر استئوکلاست‌ها را مورد بررسی و تایید قرار دادند (۲۰). نکته مهم دیگر میزان بیان پروتئین ناقل ویتامین D در ژنوتایپ های مختلف است بطوری که در مطالعات گذشته دیده شده بیشترین بیان در افراد حامل ژنوتایپ Gc1s بوده و این افراد البته کمترین میزان سطح سرمی ویتامین D را نیز نشان دادند که میتواند نشانگر اتصال قویتر به ویتامین D در این افراد باشد (۳۳). البته پلی مورفیسم‌های نواحی دیگر از این ژن مانند (-39C>T, IVS1+827C>T, IVS1+192C>T, IVS1-1154A>G, IVS11+1097G>C) نیز مورد بررسی قرار گرفته در ارتباط با تراکم استخوان دیده شد (۳۲، ۳۴).

البته تضاد در آرا محقیقن وجود دارد بطوری که برخی به نقش محافظتی ژنوتایپ Gc2 در برابر عفونت های قارچی پرداخته (۳۵) ولی عده ای دیگر هاپلوتایپ Gc1s را با احتمال برونشیت ناشی از RSV (Respiratory Syncytial Virus) در ارتباط یافتند (۳۳). البته Wei-Zhen و همکارانش تفاوت معناداری بین دو گروه مبتلا به دیابت و سالم فرانسوی در هاپلوتایپ ها و فنوتایپ های مختلف پروتئین ناقل ویتامین D را گزارش نکردند (۳۶).

ایزوفرم‌های پروتئین متصل شونده به ویتامین D (VDBP) در بسیاری از اختلالات مرتبط با سیستم ایمنی بارها مورد ارزیابی قرار گرفته است، به‌عنوان مثال به‌عنوان کاندید پیش بینی گسترش بیماری آرتریت روماتوئید در دوران کودکی توسط گروهی از محققین مورد بررسی و تایید قرار گرفت (۳۷). ارتباط امکان بقا را در افراد پیوند کلیه آلوگرافت نژاد هیسپانیک ساکن آمریکا و با هموزیگوت های Gc1 (۳۸) و نقش ریسک فاکتوری الل Gc2 در پاتوژنز آندومتریوز در بررسی های اسپکتروفتومتری جرمی-یونی (۳۹) مورد تایید قرار گفته است. ارتباط هاپلوتایپ های خاص از پروتئین ناقل ویتامین D و بیماری مولتیپل اسکلروزیس (MS) (۳۲) و رخداد بیماری گریوز و نه تیروئیدیت هاشیموتو و از همه بیشتر بیماری انسداد ریوی مزمن (COPD) نیز مورد تایید بوده است (۴۰-۴۲). همچنین شواهد فراوانی نیز مبنی بر ارتباط ژنوتایپ های مختلف Gc با رخداد انواع سرطان مانند رخداد سرطان سینه در زنان (۴۳)، سرطان کلورکتال (CRC) (۴۴) و سرطان‌های پستان، پروستات و کولورکتال (۴۵) اشاره نمود که نتایج متفاوتی را در پی داشته است. هر چند شباهت مشخصی بین مکانیسم ایجاد بیماری‌های التهابی گفته شده و پوکی استخوان وجود ندارد لیکن می توان گفت که ژن‌های دخیل در متابولیسم ویتامین D بخصوص ژن سازنده پروتئین ناقل ویتامین D می تواند در کنترل رخداد التهاب نقش موثری داشته باشد. البته مطالعات زیادی ارتباط بین ژنوتایپ های مختلف ژن ناقل ویتامین D با سطح سرمی ویتامین D در

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-12]

سنین قبل از پائسگی و پس از آن را متذکر شده‌اند (۴۶-۴۸).

علاوه بر آن بر طبق یافته‌های Nagasawa و همکارانش می‌توان گفت که محصول الل Gc1 که به آسانی به فرم فعال کننده ماکروفاژ تبدیل می‌گردد ممکن است اثر محافظت کنندگی بیشتری در برابر بیماری ها داشته باشد و بر عکس محصول آلل Gc2 در ۹۰٪ موارد، به سرعت به فرم دگلیکوزیله غیر کارآمد درمی آید که گواه بر حساس‌تر بودن این افراد در برابر بسیاری از بیماری‌ها می‌باشد، هر چند یافته های برخی مطالعات با این یافته مطابقت نمی‌کند (۲۱). البته در تایید آن می توان گفت که در بسیاری از موارد الل Gc2 در بسیاری از بیماری ها با فراوانی بیشتر ارزیابی گردید که البته بازهم در مورد تمام مطالعات مصداق ندارد.

با توجه به درصد بالای ابتلا به پوکی استخوان در زنان (حدود ۳۳٪) و نیز طرح فرضیات مختلف از نقش عوامل مختلف محیطی و وراثتی، انجام این مطالعه ضرورت پیدا نمود. در مجموع می توان گفت که پروتئین ناقل ویتامین D یک پروتئین پلئوتروپیک با نقش های متعدد و بسیار مهم در کنترل سلامت افراد می‌باشد. با اینکه در بسیاری از مطالعات ارتباط معناداری بین انواع ژنوتایپ ها و فنوتایپ های این پروتئین با رخداد بیماری وجود ندارد، لیکن می توان گفت مطالعات وسیع‌تر و البته دقیقتری در این زمینه مورد نیاز است.

بسیار واضح و کاملا شناخته شده است که نقش پروتئین Gc به‌عنوان یک پروتئین پیشساز فعال کننده ماکروفاژها و استئوکلاست‌ها در رخداد و جلوگیری از بسیاری از بیماری ها بخصوص بسیاری از بیماری‌های مرتبط با سلامت استخوان حائز اهمیت می‌باشد. لیکن پلی مورفیسم ها به تنهایی نشانگر افزایش یا کاهش خطر ابتلا به پوکی استخوان نیستند. همچنین اهمیت پلی مورفیسم‌های دیگر ژن‌های مرتبط مانند گیرنده ویتامین D (VDR) (۴۹) و نیز آنزیم غیر فعال کننده پروتئین Gc به نام ان استیل گالاکتوزامینیداز (Nagalase)، بسیار حائز اهمیت می‌باشد. با اینکه نتایج این بررسی ارتباط غیر معناداری بین هر دو پلی مورفیسم‌های rs7041 و rs4588 و رخداد پوکی استخوان در زنان یائسه نشان داد، لیکن با توجه به مقایسه نتایج مطالعات دیگر همچنان می توان گفت که با تکرار بررسی همزمان پلی مورفیسم ژن‌های ناقل ویتامین D (VDBP)، گیرنده ویتامین D (VDR)، آنزیم مهار کننده Gc-MAF (nagalase) و غلظت ویتامین D در گروه وسیع تری از مبتلایان پیش از سن یائسگی و پس از سن یائسگی در جامعه آماری با نژاد مشخص و به مراتب وسیعتر، همزمان با بررسی عملکردی می توان نتایج فوق را مورد ارزیابی واقع گرایانه قرار داد.

تقدیر و تشکر

مقاله حاضر منتج از پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی زنجان با شماره (الف- ۹۴-۲۵۶) می‌باشد. بدینوسیله از زحمات آقای دکتر مرتضوی (استاد دانشگاه علوم پزشکی زنجان)، همکاران آزمایشگاه بیمارستان حضرت ولیعصر (عج) زنجان و مرکز تحقیقات دانشگاه آزاد زنجان کمال تشکر و امتنان را داریم.

منابع

1. Lindsay R, Cosman F, Osteoporosis EB, Fauci A, Isselbacher K. Harrison's principles of internal medicine. McGraw-Hill, New York; 2001.
2. Pietschmann P, Rauner M, Sipos W, Kerschan-Schindl K. Osteoporosis: an age-related and gender-specific disease-a mini-review. Gerontology. 2009;55(1):3-12.
3. Garnero P. New developments in biological markers of bone metabolism in osteoporosis. Bone. 2014;66:46-55.
4. Riggs BL, Melton LJ, 3rd. Osteoporosis and age-related fracture syndromes. Ciba Found Symp. 1988;134:129-42.
5. Christakos S, Ajibade DV, Dhawan P, Fechner AJ, Mady LJ. Vitamin D: metabolism. Rheumatic Disease Clinics of North America. 2012;38(1):1-11.
6. Lehmann B, Meurer M. Vitamin D metabolism. Dermatologic therapy. 2010;23(1):2-12.
7. Marcus R, Majumder S. The nature of osteoporosis. Osteoporosis. 1996;1:3-17.
8. Lupsa BC, Insogna K. Bone Health and Osteoporosis. Endocrinology and metabolism clinics of North America. 2015;44(3):517-30.
9. Cummings SR, Kelsey JL, Nevitt MC,

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-12]

O'DOWD KJ. Epidemiology of osteoporosis and osteoporotic fractures. Epidemiologic reviews. 1985;7(1):178-208.

10. Halioua L, Anderson J. Lifetime calcium intake and physical activity habits: independent and combined effects on the radial bone of healthy premenopausal Caucasian women. The American journal of clinical nutrition. 1989;49(3):534-41.

11. Pietschmann P, Rauner M, Sipos W, Kerschan-Schindl K. Osteoporosis: an age-related and gender-specific disease–a mini-review. Gerontology. 2009;55(1):3-12.

12. Arai H, Miyamoto KI, Taketani Y, Yamamoto H, Iemori Y, Morita K, 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. Journal of Bone and Mineral Research. 1997;12(6):915-21.

13. Recker RR, Deng H-W. Role of genetics in osteoporosis. Endocrine. 2002;17(1):55-66.

14. Targher G, Pichiri I, Lippi G, editors. Vitamin D, thrombosis, and hemostasis: more than skin deep. Seminars in thrombosis and hemostasis; 2012.

15. Hewison M. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. Endocrinology and metabolism clinics of North America. 2010;39(2):365-79.

16. Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system. Current opinion in pharmacology. 2010;10(4):482-96.

17. Hewison M. Vitamin D and innate and adaptive immunity. Vitamins and hormones. 2010;86:23-62.

18. Chun RF. New perspectives on the vitamin D binding protein. Cell Biochem Funct. 2012;30(6):445-56.

19. Cleve H ,Constans J. The Mutants of the Vitamin-D-Binding Protein: More than 120 Variants of the GC/DBP System. Vox sanguinis. 1988;54(4):215-25.

20. Nagasawa H, Sasaki H, Uto Y, KUBO S, Hori H. Association of the macrophage activating factor (MAF) precursor activity with polymorphism in vitamin D-binding protein. Anticancer research. 2004;24(5C):3361-6.

21. Nagasawa H, Uto Y, Sasaki H, Okamura N, Murakami A, KUBO S, et al. Gc protein (vitamin D-binding protein): Gc genotyping and GcMAF precursor activity. Anticancer research. 2005;25(6A):3689-95.

22. LeBoff MS, Kohlmeier L, Hurwitz S, Franklin J, Wright J, Glowacki J. Occult vitamin D deficiency in postmenopausal US women with acute hip fracture. Jama. 1999;281(16):1505-11.

23. Garnero P, Munoz F, Sornay-Rendu E , Delmas P. Associations of vitamin D status with bone mineral density, bone turnover, bone loss and fracture risk in healthy postmenopausal women. The OFELY study. Bone. 2007;40(3):716-22.

24. Abassi M HS, Sheikholeslami H, Alizadeh SA, Rashvand Z, Yazdi Z, Najafipour R. Association Between Vitamin D Receptor Apai and Taqi Genes Polymorphism and Osteoporosis in Postmenopausal Women. J Qazvin Univ Med Sci. 2012;16(3):6.

25. Flugge J, Krusekopf S, Goldammer M, Osswald E, Terhalle W, Malzahn U, et al. Vitamin D receptor haplotypes protect against development of colorectal cancer. European journal of clinical pharmacology. 2007;63(11):997-1005.

26. Krylov M, Korotkova TA, Miakotkin VA, Benevolenskaia LI. Allele polymorphism of alkaline phosphatase, acid soluble phosphatase, and vitamin D-binding protein genes in postmenopausal osteoporosis. Ter Arkh. 2004;76(5):61-5.

27. Fang Y, van Meurs JB, Arp P, van Leeuwen JP, Hofman A, Pols HA, et al. Vitamin D binding protein genotype and osteoporosis. Calcified tissue international. 2009;85(2):85-93.

28. Thongthai P, Chailurkit LO, Chanprasertyothin S, Nimitphong H, Sritara P, Aekplakorn W, et al. Vitamin d binding protein gene polymorphism as a risk factor for vitamin d deficiency in thais. Endocr Pract. 2015;21(3):221-5.

29. Lafi ZM, Irshaid YM, El-Khateeb M, Ajlouni KM, Hyassat D. Association of rs7041 and rs4588 Polymorphisms of the Vitamin D Binding Protein and the rs10741657 Polymorphism of CYP2R1 with Vitamin D Status Among Jordanian Patients. Genet Test Mol Biomarkers. 2015;19(11):629-36.

30. Lauridsen AL, Vestergaard P, Hermann AP, Moller HJ, Mosekilde L, Nexo E. Female premenopausal fracture risk is associated with gc phenotype. J Bone Miner Res. 2004;19(6):875-81.

31. Lauridsen AL, Vestergaard P, Hermann AP, Brot C, Heickendorff L, Mosekilde L, et al. Plasma concentrations of 25-hydroxy-vitamin D and 1,25-dihydroxy-vitamin D are related to the phenotype of Gc (vitamin D-binding protein): a cross-sectional study on 595 early postmenopausal women. Calcified tissue international. 2005;77(1):15-22.

32. Ezura Y, Nakajima T, Kajita M, Ishida R, Inoue S, Yoshida H, et al. Association of Molecular Variants, Haplotypes, and Linkage Disequilibrium Within the Human Vitamin D-Binding Protein (DBP) Gene With Postmenopausal Bone Mineral Density. Journal of Bone and Mineral Research. 2003;18(9):1642-9.

33. Randolph AG, Yip WK, Falkenstein-Hagander K, Weiss ST, Janssen R, Keisling S, et al. Vitamin D-binding protein haplotype is associated with hospitalization for RSV bronchiolitis. Clin Exp Allergy. 2014;44(2):231-7.

34. Papiha S, Allcroft L, Kanan R, Francis R, Datta H. Vitamin D binding protein gene in male osteoporosis: association of plasma DBP and bone mineral density with (TAAA) n-Alu polymorphism

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-12]

in DBP. Calcified tissue international. 1999;65(4):262-6.

35. Sainsbury JP, Trajtman A, Stalker AT, Embil JM, Keynan Y. Vitamin D binding protein polymorphism protects against development of blastomycosis. J Mycol Med. 2014;24(4):328-31.

36. Ye WZ, Dubois-Laforgue D, Bellanne-Chantelot C, Timsit J, Velho G. Variations in the vitamin D-binding protein (Gc locus) and risk of type 2 diabetes mellitus in French Caucasians. Metabolism. 2001;50(3):366-9.

37. Gibson DS, Newell K, Evans AN, Finnegan S, Manning G, Scaife C, et al. Vitamin D binding protein isoforms as candidate predictors of disease extension in childhood arthritis. Journal of proteomics. 2012;75(17):5479-92.

38. Vuolo L, Di Somma C, Faggiano A, Colao A. Vitamin D and cancer. Frontiers in endocrinology. 2012;3.

39. Faserl K, Golderer G, Kremser L, Lindner H, Sarg B, Wildt L, et al. Polymorphism in vitamin D-binding protein as a genetic risk factor in the pathogenesis of endometriosis. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2011;96(1):E233-E41.

40. Pani MA, Regulla K, Segni M, Hofmann S, Hüfner M, Pasquino AM, et al. A polymorphism within the vitamin D-binding protein gene is associated with Graves' disease but not with Hashimoto's thyroiditis. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2002;87(6):2564-7.

41. Ito I, Nagai S, Hoshino Y, Muro S, Hirai T, Tsukino M, et al. Risk and severity of COPD is associated with the group-specific component of serum globulin 1F allele. Chest Journal. 2004;125(1):63-70.

42. Schellenberg D, Pare PD, Weir TD ,Spinelli JJ, Walker BA, Sandford AJ. Vitamin D binding protein variants and the risk of COPD. American journal of respiratory and critical care medicine. 1998;157(3):957-61.

43. Abbas S, Linseisen J, Slanger T, Kropp S, Mutschelknauss EJ, Flesch-Janys D ,et al. The Gc2 allele of the vitamin D binding protein is associated with a decreased postmenopausal breast cancer risk, independent of the vitamin D status. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention. 2008;17(6):1339-43.

44. Mahmoudi T, Karimi K, Arkani M, Farahani H, Nobakht H, Dabiri R, et al. Lack of associations between Vitamin D metabolism-related gene variants and risk of colorectal cancer. Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP. 2014; 15(2):957-61.

45. Rehder DS, Nelson RW, Borges CR . Glycosylation status of vitamin D binding protein in cancer patients. Protein Science. 2009;18(10):2036-42.

46. Bhan I. Vitamin d binding protein and bone health. Int J Endocrinol. 2014;2014:561214.

47. Powe CE, Evans MK, Wenger J, Zonderman AB, Berg AH ,Nalls M, et al. Vitamin D-binding protein and vitamin D status of black Americans and white Americans. N Engl J Med. 2013; 369(21):1991-2000.

48. Sinotte M, Diorio C, Berube S, Pollak M, Brisson J. Genetic polymorphisms of the vitamin D binding protein and plasma concentrations of 25-hydroxyvitamin D in premenopausal women. Am J Clin Nutr. 2009;89(2):634-40.

49. Dabirnia R, Mahmazi S, Taromchi A, Nikzad M, Saburi E. The relationship between vitamin D receptor (VDR) polymorphism and the occurrence of osteoporosis in menopausal Iranian women. Clin Cases Miner Bone Metab. 2016;13(3):190-4.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-12]

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-12]

Evaluation of rs7041 & rs4588 polymorphisms of vitamin D binding protein (VDBP) gene in postmenopausal women with osteoporosis

Masoum Nikzad Harsini, Msc of Genetics, Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Zanjan, Iran. massom.nikzad@yahoo.com
Ehsan Saburi, PhD Candidate of Molecular Medicine, Department of Molecular Medicine & Genetic, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran. ehsansaburi@yahoo.com
***Sanaz Mahmazi**, Assistant Professor, Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Zanjan, Iran (*Corresponding author). sanazmahmazi@yahoo.com
Amir Hossein Taromchi, Assistant Professor, Department of Medical Biotechnology and Nanotechnology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran. taromchei@yahoo.com

Abstract

Background: Osteoporosis as a multifactorial disease caused by decreased bone mineral density (BMD) especially calcium increasing fracture risk. Vitamin D binding protein (VDBP or Gc) is a molecule key to the biologic actions of vitamin D. Mutation in some critical areas of VDBP can affect metabolism of minerals specially calcium that are important in bone density. This study investigated association of rs7041 and rs4588 polymorphisms of VDBP gene with osteoporosis in postmenopausal Azari women in Zanjan.

Methods: This was a case-control study. Peripheral blood samples were collected from 50 osteoporosis and 50 normal postmenopausal Azari women for DNA extraction. Genotypes of rs7041 and rs4588 polymorphisms of VDBP gene were studied by PCR-RFLP. For statistical analysis we used SPSS-14, t-test and X^2.

Results: We found no significant association among rs7041 and rs4588 polymorphisms and three haplotypes (Gc1s, Gc2, Gc1f) and osteoporosis ($p>0.05$).

Conclusion: Our results suggest that genotypes of VDBP were not associated with susceptibility to osteoporosis in postmenopausal women; however, according to similar or inconsistent results in other studies from other countries, this study should be repeated in larger population and with other ethnic groups for more reliable results.

Keywords: Osteoporosis, Vitamin D Binding Protein, Polymorphism, Menopause.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-07-12]