

维生素D受体多态性与肠道CYP3A4表达：维生素D受体基因突变在人群中分布有差异吗？*★

李宝群¹, 郝志敏², 万丽娟¹

Polymorphism of vitamin D receptor and expression of CYP3A4 gene in intestinal tract: Does the distribution of vitamin D receptor mutation have difference in population?

Li Bao-qun¹, Hao Zhi-min², Wan Li-juan¹

Abstract

BACKGROUND: Studies have demonstrated that vitamin D receptor (VDR) induces CYP3A4 gene transcription and expression in tract, and the abnormality of VDR will change the quantity and quality of its protein and cause alteration of target genes transcription and expression or function in the downstream.

OBJECTIVE: To identify the effects of VDR Fok I mutation on the transcription of CYP3A4 in intestinal tract HT-29 cells.

METHODS: Hepatic tissues were obtained from hepatolithus patients and constructed pcDNA3.1(-)B-myc/his h VDR eukaryotic expression vectors (wild type and Fok I mutant). The HT-29 cells were transfected by using cell transfection technique and dual-luciferase report gene analytical system and treated by different concentrations of 1,25(OH)₂VD₃ (1, 10, and 100 nmol/L). The transcription of CYP3A4 in cultured HT-29 cells was observed.

RESULTS AND CONCLUSION: In transiently transfected HT-29 cells, the CYP3A4 luciferase activity of three concentrations (1, 10, 100 nmol/L) was increased respectively after 1,25(OH)₂VD₃ was added to cells for 24 hours, and there were significant differences between 1,25(OH)₂VD₃ group and the vehicle control group ($P < 0.05$), the luciferase activity from mutant VDR constructs was a little greater than wild VDR constructs, but there was no significant difference between the two VDR forms ($P > 0.05$). VDR Fok I mutant could not significantly change the regulational capacity of wild type VDR on CYP3A4. The results revealed that vitamin D induces CYP3A4 expression via VDR. However, compared with wild type, the VDR Fok I mutant has no obvious difference on CYP3A4 expression.

Li BQ, Hao ZM, Wan LJ. Polymorphism of vitamin D receptor and expression of CYP3A4 gene in intestinal tract: Does the distribution of vitamin D receptor mutation have difference in population? Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(24): 4533-4537. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 研究表明, 维生素D受体可以诱导肠道中CYP3A4的转录表达, 维生素D受体基因的突变将涉及到它自身所翻译的蛋白改变, 而其相应的下游靶基因的转录表达或功能亦可能会发生改变。

目的: 确定HT-29肠细胞中维生素D受体Fok I突变在对其下游靶基因CYP3A4转录的影响。

方法: 取肝胆管结石患者术中切除的肝脏组织, 构建重组真核表达载体pcDNA3.1(-)B-myc/his h维生素D受体(野生型和Fok I突变型), 利用瞬时转染技术和双荧光素酶报告基因分析系统在体外HT-29细胞中检测转染不同载体后的细胞在给予不同浓度(1, 10, 100 nmol/L)的药物1, 25(OH)₂VD₃(维生素D受体的天然配体)处理后, CYP3A4的转录表达情况。

结果与结论: 将野生型和突变型维生素D受体质粒共转染于HT-29细胞中, 在1, 25(OH)₂VD₃孵育24 h后, 3个浓度代表CYP3A4 mRNA转录水平的荧光素酶活性数值分别与溶媒对照组和空载体对照组相比差异具有显著性意义($P < 0.05$), 且转染Fok I突变型的细胞荧光素酶活性数值稍大于转染野生型的细胞荧光素酶活性数值, 但两者间差异无显著性意义($P > 0.05$)。维生素D受体Fok I突变体对其下游靶基因的转录表达与维生素D受体野生型没有差异。提示在肠细胞中, 维生素D通过维生素D受体诱导CYP3A4转录表达, 但是维生素D受体Fok I突变体对CYP3A4的转录与野生型相比差异无显著性意义。

关键词: 维生素D受体; CYP3A4; 转录调控; 荧光素酶报告基因; 肠道

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.24.038

李宝群, 郝志敏, 万丽娟. 维生素D受体多态性与肠道CYP3A4表达: 维生素D受体基因突变在人群中分布有差异吗? [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(24):4533-4537. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

CYP3A4是细胞色素P450 (CYP450)超家族的主要成员, 在药物和多种化合物的代谢中起关键作用, 其中参与了50%以上临床常用药物的代谢, 许多典型的致癌物, 前致癌物也经CYP3A4代谢转化。研究表明, CYP3A4在人体中的表达存在30倍的差异^[1], 但是迄今为

止在中国人发现的CYP3A4的SNP或频率过低或缺乏显著的功能意义都不足以解释这种巨大的个体差异, 鉴于CYP3A4蛋白表达CYP3A4 mRNA具有密切关系, 表明影响CYP3A4表达差异来自于转录水平, 所以目前CYP3A4个体活性差异的研究主要集中在其诱导机制方面。近年来发现核受体是CYP3A4基因表达的关键的转录活化因子^[2], 人类孕烷X受体(PXR), 人类构成性雄烷受体(CAR), 维

¹Department of Pharmacology, Chengde Medical University, Chengde 067000, Hebei Province, China; ²Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde 067000, Hebei Province, China

Li Bao-qun★, Master, Lecturer, Department of Pharmacology, Chengde Medical University, Chengde 067000, Hebei Province, China libao_76@163.com

Supported by the Subject of Education Department of Hebei Province, No. Z2009406*

Received: 2010-01-14 Accepted: 2010-02-19

¹承德医学院药理学教研室, 河北省承德市 067000; ²承德医学院附属医院心内科, 河北省承德市 067000

李宝群★, 女, 1976年生, 河北省隆化县人, 满族, 2007年中南大学湘雅医学院毕业, 硕士, 讲师, 主要从事遗传药理学研究。libao_76@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)24-04533-05

收稿日期: 2010-01-14
修回日期: 2010-02-19
(20090914020/W·Z)

生素D受体(VDR)这3种核受体都可以诱导CYP3A4, 有关PXR, CAR转录激活CYP3A4早年已有很多研究, 以往认为CYP3A4的诱导主要来自PXR而CAR, VDR相对较弱, 然而小肠中CYP3A4活性或个体差异与肝脏中CYP3A4活性并不相关, CYP3A4可以在肝脏高表达, 而在肠道低表达, PXR的mRNA含量在直肠明显高于小肠, 而CYP3A4在小肠黏膜近端表达最丰富, 说明在肠道的CYP3A4并不是主要由PXR调控, 而存在其他受体的调控^[3], 最近很多文献所述的研究业已证实: PXR对肝脏CYP3A4的转录调节起主要作用, VDR对肠道中CYP3A4的转录调节占有重要地位^[4]。

核受体家族的共同特征是具有高度保守的DNA结合区及一定保守性的配基结合区。维生素D受体(VDR)由427个氨基酸组成, DNA结合功能域位于N-端1~114位氨基酸残基、转录活化域位于1~190位氨基酸残基、维生素D3结合域位于115~427位氨基酸残基^[5-6]。FOKI突变为外显子2上(5, 端)的第一个起始密码子ATG的T-C变异形成, DNA推定的翻译起始密码子是高度保守的, 所以此区一旦发生突变大多具有功能意义; 这就提示VDR基因第二外显子(exon)多态性可能影响人VDR蛋白质的功能^[7]。VDR作为一种核受体, 它调控着一系列下游靶基因的转录表达^[8], 基因的突变尤其是起始密码子区的突变既涉及到它所翻译的蛋白质数量或质量的改变, 又可以导致其相应的下游基因表达或功能的改变。但到目前为止, 尚未发现VDR基因突变能够影响CYP3A4转录表达的报道。而CYP3A4的个体差异很可能是来自转录水平的差异即VDR基因突变在人群中分布的差异? 为此实验观察了VDR突变对其下游靶基因CYP3A4转录调控的作用。

1 材料和方法

设计: 单一样本观察。

时间及地点: 实验于2006-05/2008-11在河北承德医学院中心实验室完成, 实验室防护水平BSL-2。

材料:

| 试剂及仪器 | 来源 |
|---|-------------------|
| hRXR, 连接荧光素酶报告基因载体的 Luc-CYP3A4(ER6)2 | 中南大学临床药理所 博士后王果惠赠 |
| HT-29 细胞 | 课题组保存细胞株 |
| 限制性内切酶、T ₄ DNA 连接酶、Klenow 酶、RNase A、细胞裂解及荧光素酶检测试剂盒 | Promega 公司 USA |
| AMV 反转录酶 | TakaRa 公司 |
| RNAsin 和 Taq DNA 聚合酶 | Invitrogen 公司 |
| 质粒抽提试剂盒和凝胶纯化回收试剂盒 | Qiagen 公司 |

肝脏组织取自肝胆管结石患者术中切除肝脏组织。

患者35岁, 排除肿瘤、高血压与糖尿病及其家族史。根据国务院《医疗机构管理条例》规定^[9], 患者知情同意。

实验方法:

hVDR 野生型及FOKI突变体真核表达质粒的构建: 肝脏组织取自肝胆管结石患者术中切除肝脏组织, 液氮中保存。首先进行肝脏组织总RNA提取, 根据人VDR基因mRNA序列, 利用OLIGO以及Primer Premier5.0两种软件辅助设计野生型和诱变引物。

首先进行反转录: VDR野生型 cDNA全长所用引物 F: 5-tag aat tcg cca cca tgg agg caa tgg cgg c-3, R: 5-act aag ctt ggg gag atc tca ttg cca aac act tc-3。然后以第1链cDNA为模板扩增hVDR CDS全长, PCR体系为: 反转录体系2 μL, 5× PrimerStar缓冲液4 μL, dNTP 1 μL, 正向引物hVDR-F 0.5 μL, 反向引物hVDR-R 0.5 μL, PrimerStar酶0.25 μL, ddH₂O补足体积至20 μL; PCR条件为: 98 °C, 10 s, 55 °C, 15 s, 72 °C, 90 s, 35 个循环后, 72 °C, 10 min。电泳回收目的条带(约1.3 kb), 凝胶回收试剂盒纯化, 纯化的PCR产物3'末端加A后与pGEM-T载体连接。转化细菌, 制备质粒, 双酶切验证后测序。经测序验证正确的克隆质粒DNA用EcoR I和Hind III双酶切, 纯化回收1.3 kb目的片段, 与经EcoR I和Hind III消化的pcDNA3.1-myc/his B(-)载体进行连接, 构建成功后最终载体命名为hVDR-WT。构建FokI突变型真核表达载体时, 以hVDR-WT为模板, 用引入了突变位点的hVDR-FokI-F和hVDR-R引物对扩增, F: 5-tag aat tcg cca cca tgg cgg cca gca ctt c-3, R: 5-act aag ctt ggg gag atc tca ttg cca aac act tc-3。PCR产物再按上述方法构建至pcDNA3.1-myc/his B(-)载体, 并测序验证, 构建成功后目的载体命名为hVDR-FokI。

细胞培养与转染: HT-29细胞均用DMEM+体积分数为10%FBS培养基进行培养, 在37 °C、体积分数为5%CO₂条件下生长至80%汇合时进行传代, 用PBS洗涤细胞1次, 弃去PBS, 根据培养面积加入适量2.5 g/L胰酶-0.02%EDTA溶液消化细胞, 37 °C放置3~5 min, 并在倒置显微镜下观察, 待到绝大部分细胞变圆即加入培养基终止消化, 吹吸几次以离散成团的细胞, 加培养基终止后用血球计数板行细胞计数, 调节细胞浓度至8×10⁷ L⁻¹, 按1 mL/孔的量接种到24孔培养板。在培养孔中预先加入了经1 g/L明胶水溶液包被15 min处理的圆盖玻片。37 °C、体积分数为5%CO₂培养细胞24 h, 长至90%汇合, 用Lipofectamine 2000转染。(所加入的质粒和脂质体的量为24孔板一个孔的用量) 转染时将200 ng CYP3A4-(ER6)2-Luc载体, 50 ng hVDRR-WT、hVDR-FokI或pcDNA3.1-myc/his B(-)空载体, 以及作为内对照的海肾荧光素酶报告载体pRL-TK (20 ng, Promega公司)与0.5 μL LipofectamineTM 2000阳离子

脂质体混合孵育后加入至1个培养孔, 转染4 h后更换为DMEM+体积分数为10%FBS培养基, 培养20 h后, 更换为含有乙醇溶媒或不同浓度的1, 25(OH)₂D₃的培养基, 继续培养48 h后裂解细胞; 用双荧光素酶活性分析试剂盒检测荧光素酶活性。细胞转染和荧光素酶活性检测共重复3次, 每次转染均设置复孔。

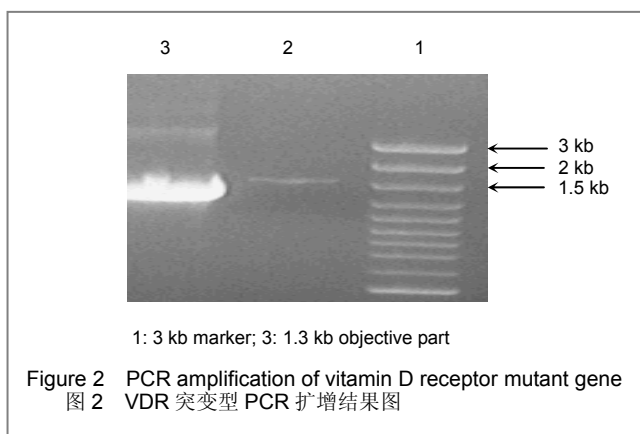
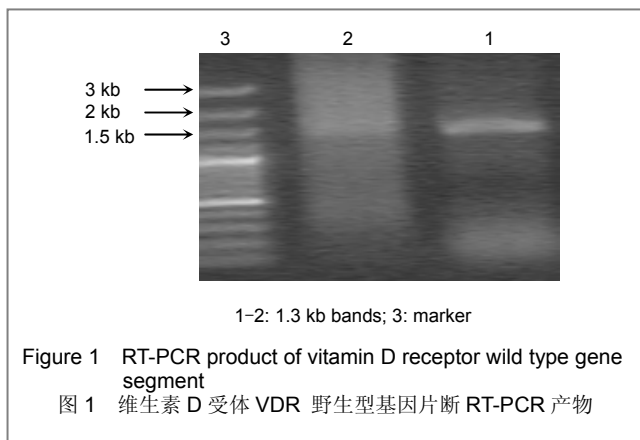
主要观察指标: ①两种质粒的酶切电泳图。②观察细胞形态及细胞表面野生型质粒, 突变型质粒, 内对照以及溶媒对照的荧光素酶活性。

设计、实施、评估者: 设计为第一作者, 实施和评估者为所有作者, 均经过系统培训。

统计学分析: 所有数据都用 $\bar{x} \pm s$ 表示。用SPSS统计软件包11.0版对各处理组荧光素酶比活性值进行ANOVA分析, 多组之间均数比较采用LSD方法。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

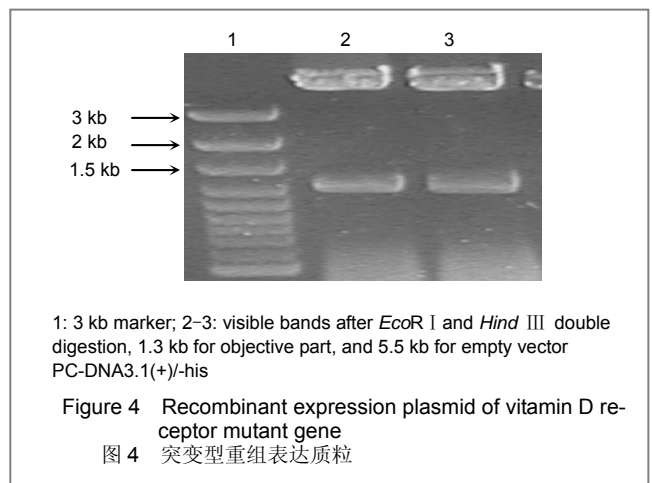
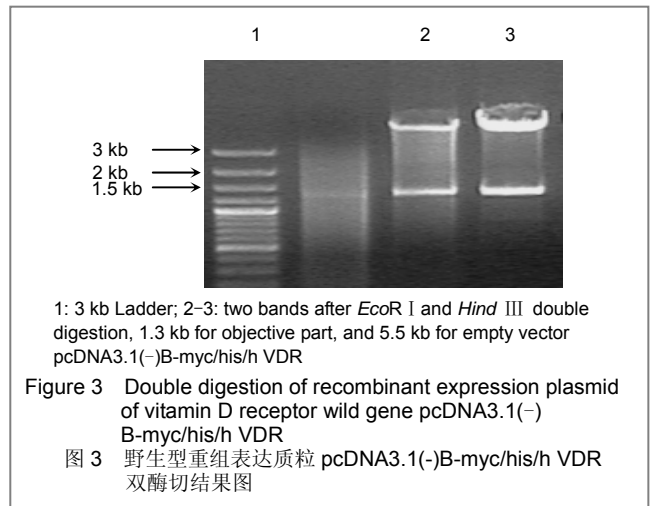
2 结果

2.1 载体构建 反转录扩增获得约1.3 kb的hVDR CDS序列条带, 见图1; 通过在引物中引入Fok I突变位点, PCR扩增得到突变型CDS序列, 见图2。

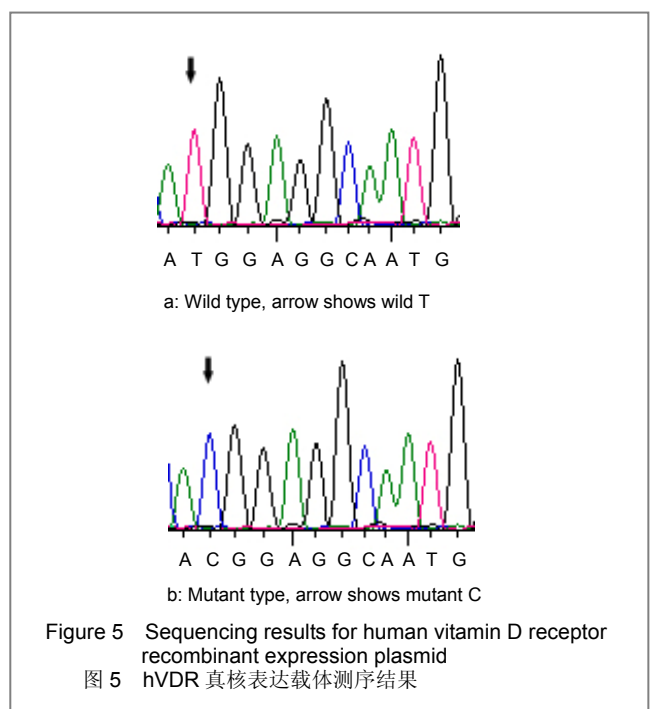


野生型和突变型CDS序列分别连接到pcDNA3.1-myc/his B(-)真核表达载体后, *EcoR* I和*Hind* III双酶

切消化后电泳检测结果见图3, 4。



构建成的hVDR-WT和hVDR-FokI表达载体最后的测序结果见图5a和5b。



经测序验证, VDR野生型和突变型真核表达载体均构建成功。

2.2 双荧光素酶活性分析结果 结果显示1, 25(OH)₂D₃ 孵育处理可激活野生型或Fok I 突变型hVDR, 进而诱导CYP3A4的ER6顺式元件所驱动的荧光素酶表达显著增强(与溶媒对照组比较, $P < 0.01$)。

在1, 10和100 nmol/L不同浓度1, 25(OH)₂D₃孵育下, 与空载体溶媒对照组比较, 野生型组荧光素酶活性分别增强7.67倍(7.67±0.88), 21.83倍(21.83±1.47)和25.03倍(25.03±2.11); 突变型组则分别为9.67倍(9.67±0.82), 23.15倍(23.15±2.36)和28.07倍(28.07±2.77)。但在各1, 25(OH)₂D₃浓度孵育下, 野生型组和突变型组之间的转录激活能力差异无显著性意义($P > 0.05$), 见表1。

| Group | Empty vector PCDNA | wild VDR | mut VDR |
|--|--------------------|-------------------------|-------------------------|
| Ethanol | 1.03±0.07 | 1.00±0.14 | 1.11±0.64 |
| 1, 25(OH) ₂ VD ₃ | | | |
| 1 nmol/L | 1.44±0.15 | 7.67±0.88 ^a | 9.67±0.82 ^a |
| 10 nmol/L | 1.59±0.21 | 21.83±1.47 ^a | 23.15±2.36 ^a |
| 100 nmol/L | 3.73±0.34 | 25.03±2.11 ^a | 28.07±2.77 ^a |

VDR: vitamin D receptor; ^a $P < 0.05$, vs. empty vector PCDNA under ethanol treatment

在1~100 nmol/L的范围内, CYP3A4 mRNA表达水平呈剂量依赖性, 在1 nmol/L的浓度就开始差异有显著性意义, 至100 nmol/L达到最佳效应; 转染野生型和突变体的VDR质粒载体在3个1, 25(OH)₂VD₃浓度组, 代表CYP3A4 mRNA转录活性的荧光素酶比活性值与溶媒对照以及空载体对照差异有显著性意义, 转染突变体组对CYP3A4 mRNA水平的转录激活能力稍高于转染野生型组对CYP3A4 mRNA水平的转录激活能力的影响, 但两者之间差异无显著性意义($P=0.95$)。

3 讨论

越来越多的研究表明, PXR对肝脏CYP3A4的转录调节起主要作用, VDR对肠道中CYP3A4的转录调节占有重要地位, 作者在此前的研究中发现在中国结直肠癌肿瘤患者中VDR的FOK1突变显著低于正常人群^[10], 似乎此突变具有功能意义, 而且对人类结直肠癌的易患性而言可能是一个保护性的突变; VDR的天然配体1, 25(OH)₂D₃具有抗肿瘤的作用, 其机制现已明确, VD₃能够抑制原癌基因表达, 促进细胞分化, 抑制增殖及诱导凋亡。在临床上已成为抗肿瘤尤其是肠道肿瘤的辅助

药物^[11-12]; 但是VD₃的化学性抗肿瘤作用正日益受到重视, 这是因为1, 25(OH)₂D₃通过VDR可以诱导CYP3A4的表达, 而CYP3A4对一些前致癌物有代谢分解的作用, 从而起到保护机体的作用。目前已明确石胆酸(LCA)为结肠致癌物, 在大肠癌的发生发展进程中起到重要作用, 而新近的研究表明CYP3A4可以代谢石胆酸为水溶性物质并经ABC转运体排出体外, 从而降低其致癌作用^[3, 13]。

基于上述研究背景, 实验旨在研究VDR Fok I 变异对其调控的CYP3A4转录激活能力的影响及其与野生型蛋白的差异, 并用以解释该变异对于VD₃的化学保护作用与人群中肠道肿瘤易患性负相关的分子机制。

而CYP3A4的个体差异很可能是来自转录水平的差异即VDR基因突变在人群中分布的差异, 为了验证这一假设作者体外构建了野生型和Fok I 突变型重组真核表达载体pcDNA3.1(-)B-myc/his h VDR, 将不同基因型的VDR质粒载体瞬时转染到HT-29细胞中, 利用双荧光素酶报告基因分析系统检测转染细胞在药物1, 25(OH)₂VD₃(VDR的天然配体)处理后CYP3A4转录的情况, 诸多文献显示, 细胞在1, 25(OH)₂VD₃的浓度为1 nmol/L直至扩大到100 nmol/L孵育18~24 h后, CYP3A4mRNA的表达水平呈现诱导趋势^[3, 13], 在高于100 nmol/L后, 细胞数目明显减少, 靶基因CYP3A4 mRNA的水平反而出现了下降的趋势。

实验选择1, 10, 100 nmol/L的1, 25(OH)₂VD₃浓度对细胞进行处理, 在加药后24h收集细胞, 裂解细胞, 进行荧光素酶活性检测。结果发现1, 25(OH)₂VD₃在1~100 nmol/L的范围内, CYP3A4 mRNA被诱导, 代表CYP3A4 mRNA转录水平的荧光素酶活性数值呈剂量依赖性上升, 无论是转染野生型还是突变体的细胞, 随着给予药物浓度的增加, 与对照组相比, 这种诱导作用逐渐加强, CYP3A4 mRNA水平明显上升, 转染野生型组, 在1~100 nmol/L的1, 25(OH)₂VD₃不同浓度下, CYP3A4 mRNA荧光素酶活性数值是溶剂组和空载体对照组的7~25倍, 差异具有显著性意义($P < 0.05$), 转染突变体组, 在1~100 nmol/L的1, 25(OH)₂VD₃不同浓度下, CYP3A4 mRNA荧光素酶活性数值为溶剂组和空白对照组的9~28倍, 差异也具有显著意义($P < 0.05$), 这与前人的研究结果相符^[14], 同时证实了实验构建的重组质粒及转染体系是正确的。

实验中发现转染VDR Fok I 突变型的细胞在不同药物浓度下CYP3A4荧光素酶活性数值稍大于转染野生型的细胞荧光素酶活性数值, 但两者间差异无显著性意义, 虽然日本学者Arai等^[15]发现Fok I 突变基因型荧光素酶报告基因的活性明显高于野生型和杂合子基因型, 很多临床资料也相继报道此突变可以使骨密度增加, 人体身高等发育指数均较未突变者为高^[16-18], 这与本实验

的结果并不矛盾, 首先由于不同的靶基因转录激活机制也不尽相同, 因为Arai等^[15]研究的是VDR Fok I 突变对24-羟化酶基因表达的影响, 再者人体内情况与体外存在很大差别, 由于人类调控机制异常复杂, 体外未发现差异的体内可能就存在差异; 体外的微小差异在体内也可能被放大或是弱化, 作者在对CYP3A4转录调控研究未发现VDR野生型和Fok I 突变存在差异, 说明CYP3A4个体差异与VDRFokI突变无关。

任何肿瘤的发生都是多因素共同影响的, 单用一个SNP对下游基因的影响来解释尚嫌不足, 由于VD3通过VDR的抑癌作用还表现在调控细胞周期蛋白等方面, 另外调节钙代谢也能协同发挥抗肿瘤作用^[19-21]; 目前有关研究VDR多态性对于其他靶基因的影响还很缺乏, 这也将是今后的方向。

4 参考文献

- [1] Bozina N, Bradamante V, Lovrić M. Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a susceptibility factor for drug response, toxicity, and cancer risk. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2009; 60(2):217-242.
- [2] Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Drocourt L, et al. The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: a tangle of networks of nuclear and steroid receptors. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1619(3): 243-253.
- [3] Wang K, Chen S, Xie W, et al. Retinoids induce cytochrome P450 3A4 through RXR/VDR-mediated pathway. *Biochem Pharmacol.* 2008;75(11):2204-2213.
- [4] Fukumori S, Murata T, Taguchi M. Rapid and drastic induction of CYP3A4 mRNA expression via vitamin D receptor in human intestinal LS180 cells. *Drug Metab Pharmacokin.* 2007;22(5): 377-381.
- [5] Peterlik M, Cross HS. Vitamin D and calcium insufficiency-related chronic diseases: molecular and cellular pathophysiology. *Eur J Clin Nutr.* 2009;9 (2):744-780.
- [6] Szeto FL, Sun J, Kong J, Duan Y, et al. Involvement of the vitamin D receptor in the regulation of NF-kappaB activity in fibroblasts. *Steroid Biochem Mol Biol.* 2007;103(3-5):563-566.
- [7] Rochel N, Hourai S, Pérez-García X, et al. Crystal structure of the vitamin D nuclear receptor ligand binding domain in complex with a locked side chain analog of calcitriol. *Arch Biochem Biophys.* 2006; 460(2):172-176.
- [8] Jurutka PW, Bartik L, Whitfield GK, et al. Vitamin D receptor: key roles in bone mineral pathophysiology, molecular mechanism of action, and novel nutritional ligands. *Bone Miner Res.* 2007; 22(Suppl 2:V):2-10.
- [9] State Council of the People's Republic of China. Administrative Regulations on Medical Institution. 1994-09-01. 中华人民共和国国务院. 医疗机构管理条例. 1994-09-01.
- [10] Wang G, Li BQ, Zhou HH. Zhongnan Daxue Xuebao: Yixueban. 2008;33(5):399-403. 王果, 李宝群, 周宏灏. 中国人结直肠癌与维生素D受体基因FokI多态性的相关性[J]. 中南大学学报: 医学版. 2008, 33(5):399-403.
- [11] Murillo G, Matusiak D, Benya RV, et al. Chemopreventive efficacy of 25-hydroxyvitamin D3 in colon cancer. *Steroid Biochem Mol Biol.* 2007;103(3-5):763-767.
- [12] Agoston ES, Hatcher MA, Kensler TW, et al. Vitamin D analogs as anti-carcinogenic agents. *Anticancer Agents Med Chem.* 2006; 6(1):53-71.
- [13] Jurutka PW, Thompson PD, Whitfield GK, et al. Molecular and functional comparison of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) and the novel vitamin D receptor ligand, lithocholic acid, in activating transcription of cytochrome P450 3A4. *J Cell Biochem.* 2005; 94(5):917-943.
- [14] Matsubara T, Yoshinari K, Aoyama K. Role of vitamin D receptor in the lithocholic acid-mediated CYP3A induction in vitro and in vivo. *Drug Metab Dispos.* 2008;36(10):2058-2063.
- [15] Arai H, Miyamoto KI, 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. *Bone Miner Res.* 1997; 12:915-921.
- [16] Remes T, Väisänen SB, Mahonen A, et al. Bone mineral density, body height, and vitamin D receptor gene polymorphism in middle-aged men. *Ann Med.* 2005;37(5):383-392.
- [17] Ivanova J, Doukova P, Boyanov M, et al. FokI and BsmI polymorphisms of the vitamin D receptor gene and bone mineral density in a random Bulgarian population sample. *Endocrine.* 2006;29(3):413-418.
- [18] Zhang C, Wang C, Liang J, et al. The vitamin D receptor FokI polymorphism and bone mineral density in Chinese children. *Clin Chim Acta.* 2008; 395(1-2):111-114.
- [19] Saramäki A, anwell CM, Campbell MJ, et al. Regulation of the human p21(waf1/cip1) gene promoter via multiple binding sites for p53 and the vitamin D3 receptor. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(2):543-554.
- [20] Luo WJ, Chen JY, Xu W, et al. Zhonghua Yufang Yixue Zazhi. 2004; 38(6):415-418. 骆文静, 陈景元, 徐文, 等. 维生素D类似物EB1089对肝癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中华预防医学杂志; 2004, 38(6):415-418.
- [21] Nakagawa K, Kawaura A, Kato S. 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a preventive factor in the metastasis of lung cancer. *Carcinogenesis.* 2005;26(2):429-440.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 河北省教育厅项目 (Z2009406) 资助。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的创新点: 本文利用构建表达载体 pcDNA3.1(-)B-myc/his h VDR(野生型和 Fok1 突变型), 利用瞬时转染技术、双荧光素酶报告基因分析和药物干预, 观察检测转染不同载体后 HT-29 细胞中 CYP3A4 的转录表达情况, 试说明维生素 D 受体多态性对肠道 CYP3A4 表达的影响, 具有一定的创新性。

课题评估的“金标准”: 实验设立的阴性空载体对照和溶媒乙醇对照, 结果表明差异具有显著性意义, 为当前国内外常用方法。

设计或课题的偏倚与不足: 任何肿瘤的发生都是多因素共同影响的, 单用一个 SNP 对下游基因的影响来解释尚嫌不足, 目前有关研究 VDR 多态性对于其他靶基因的影响还很缺乏, 这也将是今后的方向。

提供临床借鉴的价值: 实验结果表明, VDR FokI 突变体对其下游靶基因的转录表达与 VDR 野生型没有差异, 增进了维生素 D 受体多态性对肠道 CYP3A4 表达调控的认识, 有一定学术价值。