

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00359

# 宁夏回族原发性膝骨性关节炎与瘦素受体基因多态性的相关性

马晓军<sup>1</sup>, 郭浩辉<sup>1</sup>, 郝绍文<sup>1</sup>, 孙首选<sup>1</sup>, 杨小春<sup>1</sup>, 余博<sup>1</sup>, 金群华<sup>2</sup>

1. 宁夏医科大学, 银川 750004;

2. 宁夏医科大学总医院骨科三病区, 银川 750004;

**摘要:** 为探讨宁夏回族原发性膝骨性关节炎(Osteoarthritis, OA)与瘦素受体基因(Leptin receptor, *LEPR*)A668G位点单核苷酸多态性(SNPs)之间的关系, 文章运用病例-对照研究, 通过聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术, 对 148 例兼具原发症状和影像学证据的宁夏回族膝 OA 患者以及 155 名年龄、性别相匹配的对照群体进行 *LEPR* A668G SNPs 检测, 并进行测序验证, 分析 *LEPR* 基因多态性与膝 OA 的易感关联。研究表明, 膝 OA 组瘦素(Leptin, LEP)水平显著高于对照组( $P<0.001$ ), 血浆可溶性瘦素受体(sLEPR)水平较对照组明显降低( $P<0.001$ ), 膝 OA 组 *LEPR* A668G 位点 AG/GA+GG 基因型和 G 等位基因的分布频率和对照组存在差异( $P=0.008$ 和  $P=0.024$ )。研究结果提示, *LEPR* A668G 位点的多态性可能与宁夏回族人群中膝 OA 易感性相关, 可以作为预测宁夏回族膝 OA 发病危险的遗传标记及早期防治的候选基因之一。

**关键词:** 瘦素受体; 单核苷酸多态性; 病例对照研究; 骨性关节炎; 回族

## Association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in leptin receptor gene with knee osteoarthritis in the Ningxia Hui population

MA Xiao-Jun<sup>1</sup>, GUO Hao-Hui<sup>1</sup>, HAO Shao-Wen<sup>1</sup>, SUN Shou-Xuan<sup>1</sup>, YANG Xiao-Chun<sup>1</sup>, YU Bo<sup>1</sup>, JIN Qun-Hua<sup>2</sup>

1. Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China;

2. Department of Orthopedicst, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

**Abstract:** To investigate the association between primary knee osteoarthritis (OA) and single nucleotide polymorphism (SNP) (A668G) of leptin receptor gene (*LEPR*) in the Ningxia Hui population. A case-control association study has been adopted in this thesis. The polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis were performed to investigate the SNP of A668G site within *LEPR* from 148 patients with knee OA and 155 controls (asymptomatic and radiographically negative) with matched age and gender among Ningxia Hui population. In addition, genotypes of *LEPR* were verified by direct sequence analysis on PCR products. The result indicates that allele and genotype

收稿日期: 2012-11-21; 修回日期: 2013-01-27

作者简介: 马晓军, 硕士研究生, 专业方向: 关节。E-mail: vain\_goku@163.com

通讯作者: 金群华, 教授, 博士生导师, 研究方向: 关节。E-mail: wangwuxukong@163.com

网络出版时间: 2013-1-29 17:31:42

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130129.1731.004.html>

frequencies ( $P=0.024$  and  $0.008$ , respectively) in *LEPR* SNP A668G were significantly different in the knee OA patients group and control group, and in the knee OA patients group, the serum levels of leptin decreased significantly ( $P<0.001$ ) and the serum levels of soluble leptin receptor increased significantly ( $P<0.001$ ) compared with control group. Therefore, *LEPR* SNP A668G is associated with susceptibility to knee OA, which would be used as the genetic marker in predicting the risk of knee OA and would be one of the candidate genes in early prevention and control.

**Keywords:** leptin receptor; single nucleotide polymorphism; case-control study; osteoarthritis; Hui population

骨性关节炎(Osteoarthritis, OA; OMIM 165720)是最为常见的一种关节疾患<sup>[1]</sup>,膝OA常可导致老年人的关节功能障碍和残疾。国内一项研究显示:中国北方农村 60 岁或以上的女性兼具临床及影像学特征的膝OA患病率分别为 38.8%和 29.5%<sup>[2]</sup>。流行病学研究表明,它是一种复杂的多因素影响的遗传性疾病<sup>[3]</sup>。来自英国arcOGEN组织的研究表明,膝OA存在着很多相关易感基因和单核苷酸多态性(SNPs)<sup>[4]</sup>。瘦素(Leptin, LEP)是一种主要由白色脂肪组织产生、肥胖(Obese, *ob*)基因编码的分泌型蛋白质类激素,分子质量约为 16 kDa<sup>[5]</sup>。OA患者的关节液中存在LEP表达,且OA的关节软骨和骨髓中LEP的表达比正常关节软骨明显增多,而且LEP的表达程度与软骨破坏程度呈正相关<sup>[6]</sup>。LEP与其受体(Leptin receptor, *LEPR*)结合形成二聚体后,通过信号转导,调节软骨细胞代谢、炎症免疫反应、神经内分泌及血管生成,并可能参与了OA的发生发展<sup>[7]</sup>。蒋青等<sup>[8]</sup>也已发现了LEP SNPs和膝OA存在相关性。宁夏回族一直保持着严格的族内通婚制度,聚居,流动性小,饮食结构和宗教生活习惯独特,为基因关联研究提供了良好的遗传资源。本研究旨在了解*LEPR* A668G位点SNPs与宁夏回族膝OA发病的相关性,进一步理解膝OA的发病机制,并依据实验结果提出可能的病因学假说。

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

所有入选对象均为无亲缘关系、三代内无族际通婚、出生地、居住地均在宁夏地区的回族,且年龄 $\geq 40$ 岁。膝OA组 148 例(男性 46 例,女性 102 例),分别选自 2011 年 11 月至 2012 年 5 月在宁夏医科大学总医院骨科三病区、固原市原州区医院、吴

忠市医院门诊及住院部接受治疗的患者,均符合 2007 年中华医学会骨科分会骨关节炎诊治指南关于膝OA的诊断标准,并同时具有明确的膝OA症状、体征以及影像学证据(膝关节X光正侧位相的Kellgren/Lawrence评分<sup>[9]</sup> $\geq 2$ 分),且排除其他原因(包括炎症性关节炎、创伤、先天性骨骼发育不良、骨骼发育畸形等)引起的继发性膝关节疾患。健康对照组 155 例(男性 54 例,女性 101 例),不含任何关节炎或其他关节疾患的症状和体征,包括关节肿胀、皮肤触压痛、活动疼痛及受限等。所有研究对象均填写一份详尽的问卷调查,常规测量血压、体重、腰围、臀围和身高,并计算体质指数(BMI, BMI=体重(kg)/身高(m)<sup>2</sup>)以评价对象超重情况,保证对照组性别、年龄、体质指数、劳动强度与病例组匹配。此项病例对照研究经宁夏医科大学总医院伦理委员会核准执行,服从赫尔辛基宣言指导。所有研究对象均签署书面知情同意书。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 指标测定

隔夜禁食 12 h,于次日清晨采集空腹静脉血 5 mL。采用德国西门子 2400 全自动生化分析仪测定空腹血糖(FPG)、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、尿酸(UA),生化指标测定均在取血后 4 h 内完成。酶联免疫吸附法(ELISA)测定血浆 LEP、血浆瘦素受体(sLEPR)浓度。

#### 1.2.2 DNA 提取

采用天根生化科技(北京)有限公司血液基因组 DNA 试剂盒提取外周血 DNA,提取后纯化。

#### 1.2.3 引物设计和合成

扩增引物序列参照文献<sup>[10]</sup>设计,由美国英杰生命技术有限公司(Invitrogen)合成。*LEPR* A668G位

点上游序列:5'-TCCTGCTTTAAAAGCCTAATCCA GTATTT-3',下游序列:5'-AGCTAGCAAATATTTT TGTAAGCAAT-3'。

### 1.2.4 PCR 扩增和限制性酶切

PCR扩增体系为25  $\mu$ L,包括DNA模板4  $\mu$ L,上下游引物各1  $\mu$ L,2 $\times$ Reaction Mix 12.5  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 6.5  $\mu$ L。PCR扩增程序:95 预变性4 min;95 变性30 s,59 复性30 s,72 延伸30 s,30个循环;最后再72 延伸7 min,4 保存。取PCR扩增产物10  $\mu$ L,加入相应的快速限制性核酸内切酶Hpa II 1  $\mu$ L,37

恒温水浴振荡箱酶切20 min。酶切产物经2%琼脂糖凝胶电泳(180 V,25 min),经凝胶成像系统成像,检测SNP各基因型。两组样本PCR扩增产物随机抽取30例样本送Invitrogen公司进行DNA测序,验证目的基因的基因型是否与酶切电泳结果相符。

### 1.3 统计学方法

以SNP Analyzer 2.0统计软件进行Hardy-Weinberg平衡分析以判断样本的代表性。应用SPSS Statistics 17.0软件进行统计学分析。计量资料采用( $\bar{x} \pm s$ )表示,人口统计学资料及临床资料组间比较采用卡方检验和 $t$ 检验;用计数法计算各组基因型频率和等位基因频率,组间基因型、等位基因型分布频率比较用卡方检验。 $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。Logistic回归模型分析该位点基因型与膝OA发生风险率,计算比值比(Odds ratio, OR)、95%可信区间(Confidential interval, CI)和 $P$ 值, $P = 0.05$ 为检验水准。

## 2 结果与分析

### 2.1 基本资料及生化指标

研究对象的一般资料及临床参数见表1。两组患者在平均年龄、性别比例及腰臀比、体重指数等方面相比,差异无显著性( $P > 0.05$ );膝OA组FPG、TG、TC、LDL-C均明显高于正常对照组,HDL-C明显低于正常对照组,两组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ );膝OA组血浆LEP水平明显高于正常对照组,血浆sLEP水平明显低于对照组,差异均有统计学意义。本研究通过对来自宁夏回族人群的148例膝OA患者和155名健康人群的病例对照研究,病例组的性别构成(男/女)为46/102和对照组为54/101,两组间差异无统计学意义( $\chi^2 = 2.3$ ,  $P = 0.15$ );膝OA组的

平均年龄 $54.27 \pm 7.19$ 岁,对照组的平均年龄为 $53.18 \pm 6.31$ 岁,两组间的年龄差异无统计学意义( $t = 1.87$ ,  $P = 0.09$ );膝OA组的平均BMI为 $26.22 \pm 2.07$ ,对照组为 $25.62 \pm 1.74$ ,两组间差异无统计学意义( $t = 4.373$ ,  $P = 0.34$ )。说明本研究群体具有均质可比性。

### 2.2 LEPR A668G 两位点 PCR 扩增产物的酶切产物电泳结果及测序结果

LEPR A668G位点扩增产物目的片段为367 bp,A668基因型(AA型,即野生纯合型)经Hpa II酶切为242 bp、125 bp两条带,G668基因型(GG型,即纯合突变型)缺乏Hpa II酶切位点仅显示367 bp一个条带,杂和型(GA/AG型)则有3条带,即367 bp、242 bp和125 bp。经测序验证的基因分型(图1)与酶切电泳分析结果相符,且测序结果与GenBank NG\_015831.2的参照序列吻合。

### 2.3 回族 LEPR A668G 基因型频率和等位基因频率分布

根据Hardy-Weinberg平衡定律,对膝OA组和对照组人群LEPR A668G基因型分布进行群体代表性检验,LEPR A668G位点分别为 $\chi^2 = 3.206$ ,  $P = 0.073$ ;  $\chi^2 = 0.724$ ,  $P = 0.395$ 。各组 $P$ 值均 $> 0.05$ ,符合Hardy-Weinberg平衡,表示所选人群个体来自遗传平衡的种族群体,具有群体代表性。

本研究发现,回族LEPR A668G GA/AG+GG基因型在OA组分布频率明显高于对照组,AA基因型低于对照组,两组的基因型分布呈显著性差异( $P < 0.05$ );回族OA组A等位基因频率高于对照组,G等位基因频率低于对照组,两组等位基因频率分布差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,表2)。不同基因型Logistic回归分析结果见表3。

### 2.4 回族 LEPR A668G 不同基因型血浆 LEP、sLEPR 水平的比

本研究发现,回族LEPR A668G AG/GA+GG基因型血浆LEP水平高于AA基因型,血浆sLEPR水平低于AA基因型,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

### 3.1 回族膝OA患者基本临床特征的变化

为了排除体质指数、年龄、性别等物理因素对

表 1 两组基本资料和生化指标比较

	对照组 (n=155 例)	膝 OA 组 (n=148 例)	$\chi^2(t)$ 值	P 值
男/女(例数)	54/101	46/102	2.3	0.15
年龄(y)	53.18±6.31	54.27±7.19	1.87	0.09
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	25.62±1.74	26.22±2.07	4.373	0.34
腰臀比	0.88±0.36	0.94±0.42	10.564	0.11
FPG(mmol/L)	4.34±0.48	6.12±1.49	4.873	<0.001
TC (mmol/L)	5.49±1.10	4.84±1.27	8.566	<0.001
TG (mmol/L)	1.12±0.43	2.89±1.48	1.254	0.046
HDL(mmol/L)	1.81±0.54	1.07±0.38	-3.182	<0.001
LDL(mmol/L)	1.73±0.76	2.48±0.77	2.355	0.034
UA (umol/L)	8.12±1.79	11.93±1.31	-15.446	<0.001
LEP(ng/mL)	10.32±4.35	28.13±7.42	8.163	<0.001
sLEPR(ng/mL)	9.36±3.71	4.11±2.91	2.676	<0.001

注：FPG：空腹血糖；TC：总胆固醇；TG：甘油三酯；HD：高密度脂蛋白；LDL：低密度脂蛋白；UA：尿酸。

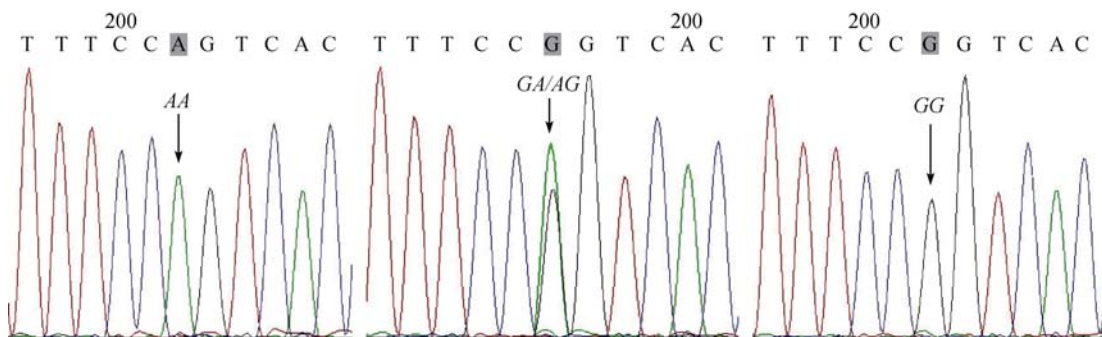


图 1 LEPR A668G 扩增产物基因型测序图谱

表 2 膝 OA 组和对照组 LEPR A668G 基因型与等位基因频率分布例数(%)

位点	分组	基因型分布						等位基因频率			
		AA		GA/AG		GG		G		A	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
A668G	膝 OA 组	31	20.9	79	53.4	38	25.7	155	52.4	141	47.6
	对照组	76	49.0	58	37.4	21	13.6	100	32.3	210	67.7
	分析	$\chi^2=9.21$				$P=0.008$		$\chi^2=21.92$		$P=0.024$	

表 3 不同基因型的 Logistic 回归分析结果

基因型	P 值	OR 值	95% CI
AG/GA vs AA	0.040	1.391	1.013~1.705
GG vs AA	0.007	2.309	1.873~2.496
AG/GA+GG vs AA	0.002	1.575	1.185~2.097

本研究结果的影响,本研究在对象选择时将体质指数、年龄、性别匹配,无统计学差异。而本研究显示膝 OA 患者的空腹血糖、尿酸、甘油三酯、胆固

醇酯、低密度脂蛋白明显升高,高密度脂蛋白明显降低,膝 OA 的患者不同程度的存在血脂异常、血糖增高等特征,提示糖、脂代谢紊乱可能对膝 OA 的病情进展起着一定的作用。

### 3.2 回族膝 OA 患者血浆 LEP、sLEPR 水平的变化

本研究中膝 OA 患者血浆 LEP 水平相较于对照组明显升高,血浆 sLEPR 水平较对照组明显降低,且血浆 LEP、sLEPR 水平呈负线性相关。Ku 等<sup>[11]</sup>发现 OA

患者关节液中瘦素浓度显著增高,而且瘦素浓度变化与X线病变程度平行; Dumond等<sup>[6]</sup>认为血浆LEP在关节腔内和循环中存在着差异,可能调节关节软骨细胞的增殖和合成,且这种差异可能影响着OA进程中的骨赘形成,血浆LEP与OA的发病密切相关。以上研究的结果与本研究的结论是相符的。考虑膝OA与瘦素水平增高的关系可能为: 瘦素诱导一氧化氮合酶(NOS)的合成,产生大量的NO,继而诱导前列腺素E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)、白细胞介素(IL)-6、IL-8等炎性介质的产生; 瘦素参与机体产生MMP-13从而引起OA<sup>[12]</sup>,已知MMPs系列是导致OA的一种重要炎性介质。

### 3.3 回族 *LEPR* 基因型及等位基因频率分布特点

人类瘦素受体基因(*LEPR*)位于 1p32,长约 5.1 kb,由 18 个外显子和 19 个内含子组成, *LEPR* A668G位于第 6 外显子内,该区域为受体胞外区基因的编码区,第 668 位存在精氨酸(A)向谷氨酰胺(G)的突变,从而导致瘦素受体与瘦素的亲和力及信号转导过程的改变,影响瘦素与受体结合和作用的发挥<sup>[13]</sup>。本研究显示,宁夏回族膝OA组*LEPR* A668G位点GA+GG基因型及G等位基因频率明显升高,AA基因型及A等位基因明显降低,说明宁夏回族携带A668G位点G等位基因的个体罹患膝OA的可能性增大,A668G位点G等位基因是宁夏回族膝OA的易感基因。研究表明,膝OA组与对照组存在统计学差异,与AA基因型比较,AG/GA、GG基因型及AG/GA+GG基因型均可增加宁夏回族膝OA的发病风险,且OR分别为 1.391、2.309 及 1.575。

### 3.4 回族 *LEPR* 基因多态性与血浆 LEP、sLEPR 水平的关系

本研究结果显示,宁夏回族人群*LEPR* A668G AG+GG基因型血浆LEP水平高于AA基因型,sLEPR水平低于AA基因型,而*LEPR* A668G位点基因多态性及高LEP、低sLEPR水平均可增加宁夏回族罹患膝OA的风险。Yiannakouris等<sup>[14]</sup>及Koh等<sup>[15]</sup>的研究表明,瘦素受体基因A668G多态性与血浆瘦素水平具有相关性,这与本研究的结论是相符的。血浆瘦素水平及瘦素受体基因多态性与种族差异有关,不同种族对疾病的易感性有所不同,提示在不同种族人群中,*LEPR*基因的SNPs可能与遗传背景和环境等因

素有关。

综上所述,我们的研究结果提示,宁夏回族膝OA组血浆LEP水平较对照组明显升高,而血浆sLEPR水平较对照组明显降低,瘦素-瘦素受体反馈调节机制可能参与膝OA的发生、发展,调节LEP、sLEPR水平可能成为防治膝OA的新途径;*LEPR*基因A668G AG+GG型可能增加宁夏回族罹患膝OA的危险性,*LEPR* A668G G等位基因可能是宁夏回族膝OA的易感基因,可作为预测宁夏回族发生膝OA危险性的遗传标志及早期防治的候选基因之一。究竟宁夏回族*LEPR*基因A668G多态性与膝OA的关系如何,可能需要多中心、更大样本、分层、分亚组进一步研究证实。

### 参考文献(References):

- [1] Fitzgerald GK, Piva SR, Irrgang JJ. Reports of joint instability in knee osteoarthritis: its prevalence and relationship to physical function. *Arthritis Rheum*, 2004, 51(6): 941-946. DOI
- [2] Kang XZ, Franssen M, Zhang YQ, Li H, Ke Y, Lu M, Su S, Song XY, Guo Y, Chen J, Niu JB, Felson D, Lin JH. The high prevalence of knee osteoarthritis in a rural Chinese population: the Wuchuan osteoarthritis study. *Arthritis Rheum*, 2009, 61(5): 641-647. DOI
- [3] Valdes AM, Spector TD. Genetic epidemiology of hip and knee osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 2011, 7(1): 23-32. DOI
- [4] Panoutsopoulou K, Southam L, Elliott KS, Wrayner N, Zhai G, Beazley C, Thorleifsson G, Arden NK, Carr A, Chapman K, Deloukas P, Doherty M, McCaskie A, Ollier WE, Ralston SH, Spector TD, Valdes AM, Wallis GA, Wilkinson JM, Arden E, Battley K, Blackburn H, Blanco FJ, Bumpstead S, Cupples LA, Day-Williams AG, Dixon K, Doherty SA, Esko T, Evangelou E, Felson D, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A, Gordon A, Gwilliam R, Hall-dorsson BV, Hauksson VB, Hofman A, Hunt SE, Ioannidis JP, Ingvarsson T, Jonsdottir I, Jonsson H, Keen R, Kerkhof HJ, Kloppenburg MG, Koller N, Lakenberg N, Lane NE, Lee AT, Metspalu A, Meulenbelt I, Nevitt MC, O'Neill F, Parimi N, Potter SC, Rego-Perez I, Riancho JA, Sherburn K, Slagboom PE, Stefansson K, Styrkarsdottir U, Sumillera M, Swift D, Thorsteinsdottir U, Tsezou A, Uitterlinden AG, van Meurs JB, Watkins B, Wheeler M, Mitchell S, Zhu Y, Zmuda JM, arcOGEN Consortium, Zeggini E, Loughlin J. Insights into the genetic architecture of osteoarthritis from stage 1 of the arcOGEN study.

- Ann Rheum Dis*, 2011, 70(50): 864–867. [DOI](#)
- [5] Zhang YY, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse *obese* gene and its human homologue. *Nature*, 1994, 372(6505): 425–432. [DOI](#)
- [6] Dumond H, Presle N, Terlain B, Mainard D, Loeuille D, Netter P, Pottier P. Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(11): 3118–3129. [DOI](#)
- [7] Figenschau Y, Knutsen G, Shahazeydi S, Johansen O, Sveinbjörnsson B. Human articular chondrocytes express functional leptin receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 287(1): 190–197. [DOI](#)
- [8] Qin JH, Shi DQ, Dai J, Zhu LQ, Tsezou A, Jiang Q. Association of the leptin gene with knee osteoarthritis susceptibility in a Han Chinese population: a case-control study. *J Hum Genet*, 2010, 55(10): 704–706. [DOI](#)
- [9] Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 1957, 16(4): 485–493. [DOI](#)
- [10] Franek E, Nowak J, Safranow K, Adler G, Bińczak-Kuleta A, Ciechanowicz A, Wiecek A. G(–2548)A leptin gene polymorphism in obese subjects is associated with serum leptin concentration and bone mass. *Pol Arch Med Wewn*, 2010, 120(5): 175–180. [DOI](#)
- [11] Ku JH, Lee CK, Joo BS, An BM, Choi SH, Wang TH, Cho HL. Correlation of synovial fluid leptin concentrations with the severity of osteoarthritis. *Clin Rheumatol*, 2009, 28(12): 1431–1435. [DOI](#)
- [12] Zhang FM, Basinski MB, Beals JM, Briggs SL, Churgay LM, Clawson DK, DiMarchi RD, Furman TC, Hale JE, Hsiung HM, Schoner BE, Smith DP, Zhang XY, Wery JP, Schevitz RW. Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature*, 1997, 387(6629): 206–209. [DOI](#)
- [13] Chung WK, Power-Kehoe L, Chua M, Chu F, Aronne L, Huma Z, Sothorn M, Udall JN, Kahle B, Leibel RL. Exonic and intronic sequence variation in the human leptin receptor gene (LEPR). *Diabetes*, 1997, 46(9): 1509–1511. [DOI](#)
- [14] Yiannakouris N, Yannakoulia M, Melistas L, Chan JL, Klimis-Zacas D, Mantzoros CS. The Q223R polymorphism of the leptin receptor gene is significantly associated with obesity and predicts a small percentage of body weight and body composition variability. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(9): 4434–4439. [DOI](#)
- [15] Koh JM, Kim DJ, Hong JS, Park JY, Lee KU, Kim SY, Kim GS. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms PvuII and XbaI influence association between leptin receptor gene polymorphism (Gln223Arg) and bone mineral density in young men. *Eur J Endocrinol*, 2002, 147(6): 777–783. [DOI](#)