

Utjecaj polimorfizma mikrosatelitnog lokusa (CA)_n unutar gena za IGF-1 na vršnu koštanu masu u muškaraca

The role of IGF-1 (CA)_n polymorphism on peak bone mass attainment in males

Darko Kaštelan^{1*}, Zorana Grubić², Katarina Štingl², Ivana Kraljević¹, Tina Dušek¹, Feđa Džubur¹, Zlatko Giljević¹, Vesna Kerhin-Brkljačić², Mirko Koršić¹

¹Zavod za endokrinologiju, Klinika za unutrašnje bolesti, KBC Zagreb

²Centar za tipizaciju tkiva, KBC Zagreb

Prispjelo: 10. 12. 2008.

Prihvaćeno: 12. 1. 2009.

Adresa za dopisivanje:

* **Doc. dr. sc. Darko Kaštelan, dr. med.,**
Zavod za endokrinologiju, KBC Zagreb,
Kišpatićeva 12, 10 000 Zagreb
e-mail: dkastelan@inet.hr

SAŽETAK. Cilj: Idiopatska osteoporozna u muškaraca prvenstveno je posljedica niske vršne koštane mase koja je genetski uvjetovana. S obzirom na njegovu važnu ulogu u metabolizmu kosti, između brojnih gena kandidata u patogenezi osteoporozne, od posebnog je interesa gen za čimbenik rasta sličan inzulinu (IGF-1). Prethodna istraživanja pokazala su da je polimorfizam mikrosatelitne regije citozin-adenin (CA)_n unutar gena za IGF-1 povezan sa serumskom koncentracijom IGF-1, stoga je primarni cilj ovog istraživanja bio analizirati utjecaj ovog polimorfizma na vršnu koštanu masu u muškaraca. **Metode:** U istraživanje su uključena 92 zdrava muškarca u dobi od 21 do 35 godina. Svakom je ispitaniku izmjerena mineralna gustoća kosti (BMD) u lumbalnoj kralježnici i proksimalnom dijelu bedrene kosti, koncentracije biljega koštane pregradnje, 25-OHD i spolnih hormona. **Rezultati:** Ispitanici u kojih je nađen alel (CA)₁₈ (genotip 18+) imali su niži BMD u svim mjerenim područjima, no razlike između ispitivanih skupina nisu bile statistički značajne. Ipak, u homozigota (CA)₁₈ nađen je značajno niži BMD u području vrata bedrene kosti (P=0,03), trohantera (P=0,01) i proksimalnog dijela bedrene kosti (P=0,04), dok razlike u koncentracijama biljega koštane pregradnje, 25-OHD, slobodnog testosterona i estradiola nisu bile statistički značajne. **Rasprava:** Rezultati ovog istraživanja ukazali su na mogući negativan utjecaj alela IGF-1 (CA)₁₈ na vršnu koštanu masu u muškaraca. Ipak, za definitivne zaključke o ulozi tog polimorfizma u patogenezi osteoporozne potrebna su daljnja istraživanja na većem broju ispitanika i u različitim populacijama.

Ključne riječi: gen za IGF-1, mineralna gustoća kosti, muškarci, osteoporozna, vršna koštana masa

ABSTRACT. Aim: Idiopathic osteoporosis in males is influenced predominantly by low peak bone mass as a feature under a strong genetic control. Among number of candidate genes, IGF-1 gene is of particular interest due to its important role in bone metabolism. It has been reported that IGF-1 cytosine-adenine (CA)_n polymorphism is related to serum IGF-1 concentration. Therefore, in the present study we examined the influence of certain IGF-1 (CA)_n alleles on peak bone mass attainment in males. **Methods:** Study sample consisted of 92 unrelated healthy male volunteers, aged 21-35. In each subject, lumbal spine and proximal femur bone mineral density (BMD), bone turnover markers, 25-OHD and sex hormones levels were measured. **Results:** IGF-1 (CA)₁₈ allele (genotype 18+) were found to be associated with lower BMD in all measured areas but the differences between analysed groups were not significant. However, homozygotes (CA)₁₈ had significantly lower femoral neck (P=0,03), trochanter (P=0,01) and total hip (P=0,04) BMD whereas differences in bone turnover markers, 25-OHD, free testosterone and estradiol concentrations were not significant. **Discussion:** The results of the present study suggested possible negative effect of the IGF-1 (CA)₁₈ allele on the peak bone mass attainment in males. However, for definitive conclusion about the role of this polymorphism in the pathogenesis of osteoporosis further studies in different populations and with larger number of participants are needed.

Key words: bone mineral density, IGF-1 gene, males, osteoporosis, peak bone mass

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

UVOD

Posljednjih nekoliko godina problem osteoporoze u muškaraca sve više zaokuplja pažnju stručnjaka. Na temelju malog broja dosadašnjih istraživanja, teško je precizno odrediti učestalost ove bolesti u muškaraca. Rezultati nedavnog istraživanja u hrvatskoj populaciji pokazali su da 16,2 % muškaraca starijih od 50 godina ima osteoporozu¹.

Idiopatska osteoporoza, najčešći oblik ove bolesti u muškaraca, uzrokovana je ponajprije niskom vršnom koštanom masom. Čitav niz gena utječe na postizanje vršne koštane mase, a time i na nastanak osteoporoze u kasnijoj dobi. Istraživanja na blizancima pokazala su da je 50 – 85 % varijacija mineralne gustoće kosti (engl. *bone mineral density* – BMD) određeno genetskim čimbenicima^{2,3}. Popis gena koji su istraženi kao mogući kandidati u patogenezi osteoporoze prikazan je u tablici 1⁴. Razumijevanje mehanizama kojima geni određuju sklonost nastanku osteoporoze moglo bi imati značajnu ulogu u kliničkom radu: pojedini geni mogli bi se koristiti kao dijagnostički biljezi u procjeni rizika nastanka osteoporoze, a mogli bi biti i potencijalna “meta” u dizajniranju novih lijekova za liječenje osteoporoze. Uz to, postoje dokazi koji ukazuju da geni moduliraju učinkovitost lijekova za osteoporozu⁵.

Istraživanja povezanosti pojedinih gena s nastankom osteoporoze (asocijacijske studije) ukazala su na niz polimorfizama koji su udruženi s BMD-om, gubitkom koštane mase i osteoporotičnim prijelomima. Istraživanja provedena u hrvatskoj populaciji ukazala su na značajan utjecaj delecije/insercije 3-pb unutar četvrtog introna gena za aromatazu⁶, te polimorfizma mikrosatelitnog lokusa TA unutar gena za alfa receptor za estrogen⁷ na vršnu koštanu masu.

Stimuliranjem funkcije osteoblasta i sprječavanjem degradacije kolagenog matriksa kosti, inzulinu sličan čimbenik rasta I (engl. *insulin-like growth factor I*; IGF-I) ima jednu od ključnih uloga u metabolizmu koštanog tkiva. Kost je ciljno tkivo anaboličkog djelovanja IGF-I, što potvrđuje i na-

zočnost receptora za IGF-I na osteoblastima. Koncentracija IGF-I u serumu neovisni je predskazatelj vrijednosti BMD-a u lumbalnoj kralježnici i Wardovom trokutu⁸. Nedavno objavljeno istraživanje pokazalo je da je polimorfizam mikrosatelitne regije citozin-adenin (CA)_n, udaljene jednu kilobazu od transkripcijskog mjesta za IGF-I, povezan sa serumskom koncentracijom IGF-I⁹, stoga je primarni cilj ovog istraživanja bio analizirati utjecaj polimorfizma mikrosatelitnog lokusa CA na vršnu koštanu masu u muškaraca.

Idiopatska osteoporoza, najčešći oblik ove bolesti u muškaraca, uzrokovana je ponajprije niskom vršnom koštanom masom. Čitav niz gena utječe na postizanje vršne koštane mase, a time i na nastanak osteoporoze u kasnijoj dobi. Razumijevanje mehanizama kojima geni određuju sklonost nastanku osteoporoze moglo bi imati značajnu ulogu u kliničkom radu: pojedini geni mogli bi se koristiti kao dijagnostički biljezi u procjeni rizika nastanka osteoporoze, a mogli bi biti i potencijalna “meta” u dizajniranju novih lijekova za liječenje osteoporoze.

ISPITANICI

U istraživanje su uključena 92 muškarca u dobi od 21 do 35 godina. Ispitanici su bili upoznati s protokolom i ciljevima istraživanja, a prije uključivanja u istraživanje potpisali su informirani pristanak. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo KBC-a “Zagreb” i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Nitko od ispitanika nije imao bolest ili uzimao lijekove koji utječu na metabolizam kosti.

METODE

BMD lumbalne kralježnice i proksimalnog dijela bedrene kosti izmjeren je aparatom QDR Delphi (Hologic). T-vrijednost je izračunata na temelju podataka proizvođača.

Svim ispitanicima određene su serumске koncentracije koštanog izoenzima alkalne fosfataze (K-AP) i osteokalcina kao biljega koštane izgradnje, te β-crosslapsa kao biljega koštane razgradnje. Sva tri biljega određena su metodom ELISA tvrtke Nordic Bioscience Diagnostics.

Estradiol (E₂) je određen metodom ELISA koristeći ligande tvrtke Ortho Johnson & Johnson,

slobodni testosteron je određen radioimunokemijskom metodom tvrtke DPC, a 25-OHD je određen metodom ELISA tvrtke IDS.

Za određivanje alela STR lokusa, svim ispitanicima je uzeto 5 ml periferne krvi s EDTA iz kojih je izolirana DNA pomoću komercijalnog kita za izolaciju DNA (**Nucleospin Blood kit, Macherey-Nagel, Duren**, Njemačka). Redoslijed nukleotida korištenih primera – **početnica za umnažanje testiranog mikrosatelitnog lokusa unutar gena za IGF-1 bio je sljedeći: GCTAGCCAGCTGGTGTATT i ACCACTC-TGGGAGAAGGGTA** (5' kraj primera bio je obilježen fluorescentnom bojom Cy-5). Uvjeti umnažanja tj. lančane reakcije polimerazom (PCR) opisani su u ranijem istraživanju⁹. Nakon PCR amplifikacije u stroju za umnažanje (GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosystems, Foster City, SAD) uzorci su dalje analizirani za dužinu fragmenata u aparatu za automatsko određivanje dužine pojedine sekvence (ALFexpress, Pharmacia-Amersham, Uppsala, Švedska). Dužina fragmenata, odnosno alela određivana je pomoću laserom pobuđene fluorescencije i programa AlleleLocator-a (ALFexpress, Pharmacia-Amersham, Uppsala, Švedska).

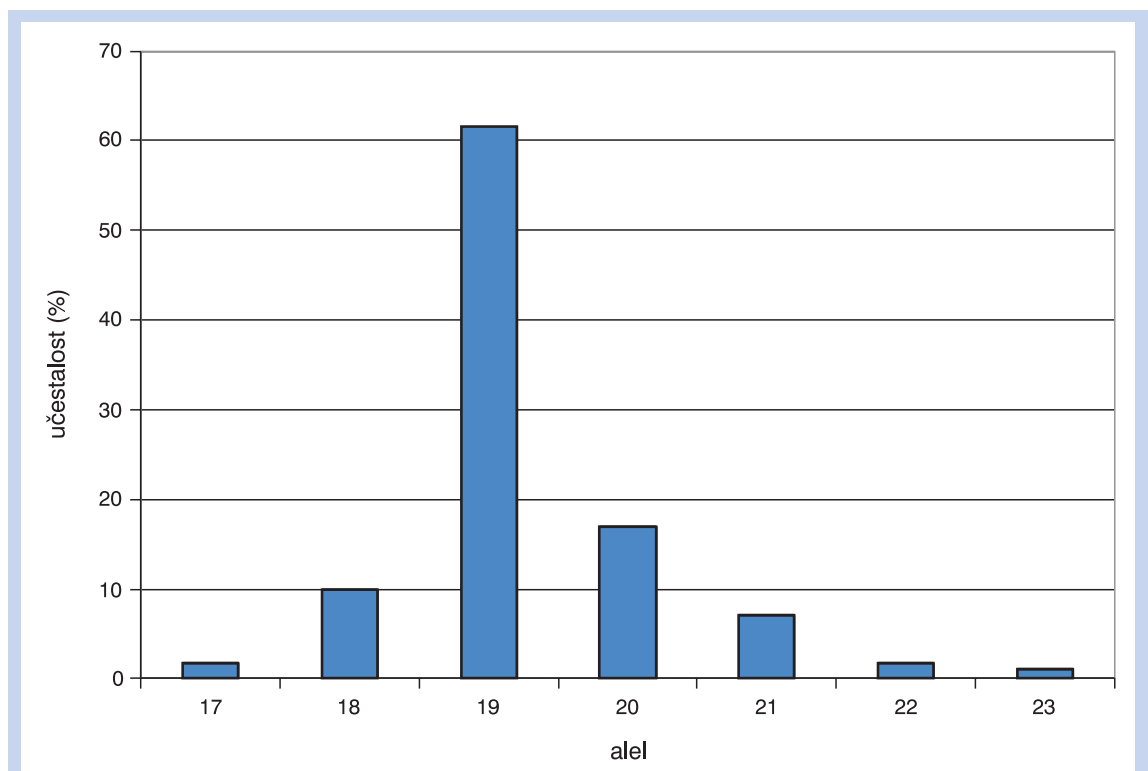
STATISTIČKA ANALIZA

Za statističku analizu međuovisnosti genetskih polimorfizama, BMD-a, koncentracije biljega koštane pregradnje i koncentracije hormona korišteni su t-test za brojčane podatke s normalnom distribucijom i Mann-Whitney test za podatke koji ne pokazuju normalnu distribuciju. U analizi je korišten statistički paket SAS 8.0.2, s razinom statističke značajnosti $p < 0,05$.

REZULTATI

Učestalost alela IGF-1 (CA)_n u populaciji prikazana je na grafikonu 1. Sedam različitih alela označeno je brojevima od 17 do 23, ovisno o broju ponavljanja sekvence CA. Najveću učestalost pojavljivanja u populaciji imao je alel (CA)₁₉ (61,2 %), dok su aleli (CA)₁₇, (CA)₂₂ i (CA)₂₃ bili zastupljeni u populaciji s učestalošću manjom od 2 %.

Ispitanici u kojih je nađen alel (CA)₁₈ (genotip 18+) imali su niži BMD u svim mjerenim područjima, no razlike između ispitivanih skupina nisu bile statistički značajne (tablica 2). Budući da su ovi rezultati upućivali na mogući utjecaj alela (CA)₁₈ na



Grafikon 1. Učestalost alela mikrosatelita (CA)_n unutar gena za IGF-I u muškaraca u Hrvatskoj
Graph 1 Distribution of IGF-1 (CA)_n alleles in the Croatian male population

Tablica 1. Geni-kandidati u patogenezi osteoporoze**Table 1** Candidate genes in the osteoporosis pathogenesis

Ime gena	Simbol
Kalcotropni hormoni i receptori	
Receptor za vitamin D	VDR
Receptor za estrogen tip 1 i 2	ESR 1 i 2
Receptor za kalcitonin	CALCR
Paratiroidni hormon	PTH
Receptor za paratiroidni hormon 1	PTH1R
Kalcij sensing receptor	CASR
Aromataza	ARO
Receptor za glukokortikoide	GR
Citokini, čimbenici rasta i receptori	
Transformirajući čimbenik rasta beta 1	TGFβ1
Čimbenik rasta sličan inzulinu	IGF-I
Interleukin-6	IL6
Inerleukin 1β	IL-1β
Antagonist receptora za interleukin 1	IL-1 RA
Tip 2 receptora za čimbenik nekroze tumora	TNFR2
Koštani morfogenetski protein 4	BMP-4
Koštani matriks	
Alfa 1 lanac tipa 1 kolagena	COLIA1
Osteokalcin	
Kolagenaza	
α HS2 glikoprotein	
Ostalo	
Apolipoprotein E	APOE
Reduktaza metilen tetrahidrofolata	MTHFR
P57 Kip	
Glavni sustav tkivne snošljivosti	HLA
PPAR γ	
Werner Helicase gene	

vršnu koštanu masu, u daljnjoj analizi učinjena je usporedba između homozigota (CA)₁₈ i ostalih ispitanika (tablica 3). U homozigota (CA)₁₈ nađen je značajno niži BMD u području vrata bedrene kosti (P=0,03), trohantera (P=0,01) i proksimalnog dijela bedrene kosti (P=0,04), dok razlike u koncentracijama biljega koštane pregradnje, 25-OHD, slobodnog testosterona i estradiola nisu bile statistički značajne.

RASPRAVA

IGF-I je važan regulator metabolizma kosti upravo svojim utjecajem na diferencijaciju, sazrijevanje i novačenje osteoblasta^{10,11}, te poticanjem sinteze specifičnih koštanih proteina¹². Osim u jetri, sintetizira se i lokalno, u koštanom tkivu. Nekoliko istraživanja ukazalo je na niže koncentracije IGF-I u bolesnika s idiopatskom osteoporozom^{13,14}. Istraživanje Rosena i sur. pokazalo je i da varijacije u koncentraciji IGF-I mogu biti posljedica polimorfizma mikrosatelita (CA)_n unutar gena za IGF-1¹⁴. Ova mikrosatelitna regija nalazi se 1000 pb ispred mjesta početka transkripcije i ima specifičnu regulatornu ulogu¹⁵, pa je stoga i razumljivo da alelske varijacije ovog mikrosatelita mogu mijenjati transkripciju IGF-I¹⁶. Alternativna je mogućnost da je ovaj polimorfizam u neravnoteži udruživanja s nekom drugom kromosomskom regijom koja utječe na stabil-

Tablica 2. Značajke ispitanika ovisno o nazočnosti alela IGF-1 (CA)₁₈**Table 2** The characteristics of the study subjects with the presence or absence of IGF-1 (CA)₁₈ allele

	genotip 18+ (n=15)	genotip 18 – (n=77)	P vrijednost
Dob (god.)	29,4±3,7	30,5±5,3	NS
Visina (cm)	184,4±6,8	181,1±6,6	NS
Težina (kg)	85,2±10,2	80,1±10,6	NS
BMI (kg/m ²)	25,1±3,2	24,4±2,4	NS
K-AP (IU/L)	9,8±2,8	9,8±2,2	NS
Estradiol (pmol/l)	57,6±19,5	58,6±27,3	NS
Sl. testosteron (pmol/l)	51,3±13,7	53,0±15,8	NS
25(OH)D3 (nmol/l)	34,6±18,2	48,4±27,4	0,02
Osteokalcin (μg/l)	12,2±4,3	11,4±4,7	NS
β-crosslaps (μg/l)	0,24±0,09	0,21±0,10	NS
LS BMD (g/cm ²)	1,05±0,13	1,08±0,14	NS
Femoral neck BMD (g/cm ²)	0,88±0,13	0,93±0,14	NS
Total hip BMD (g/cm ²)	1,05±0,15	1,08±0,15	NS
Trochanter BMD (g/cm ²)	0,78±0,15	0,81±0,13	NS

NS – nije statistički značajno; BMI – indeks tjelesne mase; K-AP – koštana alkalna fosfataza; LS – lumbalna kralježnica; BMD – mineralna gustoća kosti.

Tablica 3. Usporedba homozigota IGF-1 (CA)₁₈ i ostalih ispitanika**Table 3** Comparison between IGF-1 (CA)₁₈ homozygotes and other participants

	Homozigoti (n=3)	Ostali (n=89)	P vrijednost
Dob (god.)	30,3±3,2	30,3±5,1	NS
Visina (cm)	179,8±8,8	181,7±6,7	NS
Težina (kg)	82,6±12,3	80,9±10,6	NS
BMI (kg/m ²)	25,6±4,0	24,4±2,5	NS
K-AP (IU/L)	9,5±2,1	9,5±2,4	NS
Estradiol (pmol/l)	54,3±22,7	58,6±26,4	NS
Sl. testosteron (pmol/l)	48,7±12,4	57,8±15,6	NS
25(OH)D3 (nmol/l)	27,8±11,8	54,2±27,0	NS
Osteokalcin (μg/l)	11,5±2,2	11,9±4,7	NS
β-crosslaps (μg/l)	0,17±0,06	0,23±0,10	NS
LS BMD (g/cm ²)	0,95±0,06	1,08±0,14	NS
Femoral neck BMD (g/cm ²)	0,75±0,08	0,93±0,13	0,03
Total hip BMD (g/cm ²)	0,91±0,07	1,08±0,14	0,04
Trochanter BMD (g/cm ²)	0,62±0,03	0,81±0,13	0,01

NS – nije statistički značajno; BMI – indeks tjelesne mase; K-AP – koštana alkalna fosfataza; LS – lumbalna kralježnica; BMD – mineralna gustoća kosti.

nost molekule IGF-I, odnosno na vrijeme poluživota IGF-1 u serumu¹⁷. Za razliku od rezultata Rosena i sur., Kato i sur. u svom istraživanju nisu utvrdili povezanost između polimorfizma mikrosatelita (CA)_n i koncentracije IGF-1¹⁸. Ipak, potrebno je istaknuti da su rezultati obje studije ograničeni relativno malim brojem ispitanika, pa je za konačni zaključak potrebno sačekati nova istraživanja na većem broju ispitanika. Pored toga, potrebno je odgovoriti i na pitanje je li serumska koncentracija IGF-I povezana s tkivnom ekspresijom ovog hormona.

U posljednje je vrijeme nekoliko istraživanja analiziralo povezanost između broja ponavljanja sekvence CA unutar gena za IGF-I i BMD-a^{14,19,20}, no

dobiveni rezultati su neujednačeni. Naime, Kim i sur. su u studiji koja je uključivala 300 postmenopausalnih žena našli da homozigoti za alel (CA)₂₀ imaju veći BMD lumbalne kralježnice i proksimalnog dijela bedrene kosti u odnosu na ostalu populaciju⁹. U istraživanju Rosena i sur. nađen je niži BMD u lumbalnoj kralježnici i bedrenoj kosti, kao i niža koncentracija IGF-1 u homozigota za alel (CA)₁₉¹⁴. Nasuprot tome, u druga dva istraživanja nije nađena povezanost između polimorfizma mikrosatelita (CA)_n i BMD-a^{19,20}, iako je u istraživanju provedenom u japanskoj populaciji mala skupina postmenopausalnih žena (n=4) koje su bile homozigoti za alel (CA)₁₈ imala značajno manji BMD i u lumbalnoj kralježnici i u bedrenoj kosti¹⁹.

Za razliku od spomenutih istraživanja u kojima su ispitanici bile starije osobe, u naše istraživanje uključeni su bili zdravi muškarci u dobi formiranja vršne koštane mase. Naime, u ispitivanjima na *knock-out* miševima za gen za IGF-1 zamijećen je zakašnjeni razvoj kosti²¹. To navodi na zaključak da IGF-1 prvenstveno utječe

Iako u našem istraživanju nismo našli statistički značajnu povezanost između pojedinih alela IGF-1 (CA)_n i BMD-a, čini se da postoji negativan utjecaj alela (CA)₁₈ na vršnu koštanu masu u muškaraca. Naime, u usporedbi s ostalim ispitanicima, homozigoti (CA)₁₈ imali su značajno niži BMD u području vrata bedrene kosti, trohantera bedrene kosti i proksimalnog dijela bedrene kosti, stoga bi se ovaj genotip mogao koristiti kao biljeg povećanog rizika za osteoporozu. Ipak, za definitivne zaključke o ulozi ovog polimorfizma u patogenezi osteoporoze potrebna su nova istraživanja na većem broju ispitanika i u različitim populacijama.

na stvaranje kosti u mladosti, a znatno manje na gubitak koštane mase u starijoj dobi, kada brojni drugi genetski čimbenici, kao i čimbenici okoline, umanjuju njegov učinak na kost.

Rezultati našeg istraživanja ukazali su na niži BMD u svim mjerenim područjima u ispitanika s alelom (CA)₁₈, no ove razlike nisu bile statistički značajne. Ipak, u homozigota (CA)₁₈ nađen je značajno niži BMD u području vrata bedrene kosti (P=0,03), trohantera bedrene kosti (P=0,01) i proksimalnog dijela bedrene kosti (P=0,04). Slične rezultate polučilo je istraživanje koje su proveli Miyao i sur. u populaciji žena s postmenopausalnom osteoporozom¹⁹. Rezultati istraživanja dijelom su ograničeni činjenicom da je ono provedeno na relativno malom uzorku ispitanika, te stoga statistička snaga istraživanja nije dovoljna za donošenje konačnih zaključaka o povezanosti polimorfizma mikrosatelita (CA)_n unutar gena za IGF-1 i vršne koštane mase. Ipak, mišljenja smo da istraživanje u značajnoj mjeri proširuje dosadašnje spoznaje.

ZAKLJUČAK

Iako u našem istraživanju nismo našli statistički značajnu povezanost između pojedinih alela IGF-1 (CA)_n i BMD-a, čini se da postoji negativan utjecaj alela (CA)₁₈ na vršnu koštanu masu u muškaraca. Naime, u usporedbi s ostalim ispitanicima, homozigoti (CA)₁₈ imali su značajno niži BMD u području vrata bedrene kosti, trohantera bedrene kosti i proksimalnog dijela bedrene kosti, stoga bi se ovaj genotip mogao koristiti kao biljeg povećanog rizika za osteoporozu. Ipak, za definitivne zaključke o ulozi ovog polimorfizma u patogenezi osteoporoze potrebna su nova istraživanja na većem broju ispitanika i u različitim populacijama.

LITERATURA

1. Kaštelan D, Kujundžić Tiljak M, Kraljević I, Kardum I, Giljević Z, Korsić M. Calcaneus ultrasound in males – normative data in the Croatian population (ECUM study). *J Endocrinol Invest* 2006;29:221-5.
2. Christian JC, Yu PL, Slemenda CW, Johnston CC Jr. Heritability of bone mass: a longitudinal study in aging male twins. *Am J Hum Genet* 1989;44:429-3.
3. Pocock NA, Eisman JA, Hopper JL, Yeates MG, Sambrook PN, Eberl S. Genetic determinants of bone mass in adults: a twin study. *J Clin Invest* 1987;80:706-10.
4. Ralston SH. Genetic control of susceptibility to osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2460-6.
5. Qureshi AM, Herd RJ, Blake GM, Fogelman I, Ralston SH. COLIA1 Sp1 polymorphisms predict response of femoral neck bone mineral density to cyclical etidronate therapy. *Calcif Tissue Int* 2002;70:158-63.
6. Kastelan D, Grubic Z, Kraljevic I, Duric K, Kardum I, Dusek T et al. Decreased peak bone mass is associated with a 3-bp deletion/insertion of the CYP19 intron 4 polymorphism: a preliminary data from the GOOS study. *J Endocrinol Invest* 2007;30:465-9.
7. Kastelan D, Grubic Z, Kraljevic I, Polasek O, Dusek T, Stingl K et al. The role of estrogen receptor- α gene TA polymorphism and aromatase gene TTTA polymorphism on peak bone mass attainment in males: is there an additive negative effect of certain allele combinations? *J Bone Miner Metab* 2009; In press.
8. Kim JG, Shin CS, Choi JM, Moon SY, Kim SY, Lee JY. The relationship among circulating insulin-like growth factor components, biochemical markers of bone turnover and bone mineral density in postmenopausal women under age of 60. *Clin Endocrinol* 1999;51:301-7.
9. Kim JG, Roh KR, Lee JY. The relationship among serum insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-I gene polymorphism, and bone mineral density in postmenopausal women in Korea. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186:345-50.
10. Jones JL, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995; 16:3-32.
11. Rosen C, Donahue LR, Hunter SJ. Insulin-like growth factors and bone: the osteoporosis connection. *Proc Soc Exp Biol Med* 1994;206:83-102.
12. Hock JM, Centrella M, Canalis E. Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology* 1988;122:254-60.
13. Reed BY, Zerwekh JE, Sakhaee K, Breslau NA, Gottschalk F, Pak CYC. Serum IGF-I is low and correlated with osteoblastic surface in idiopathic osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1995;10:1218-24.
14. Rosen CJ, Kurland ES, Vereault D, Adler RA, Rackoff PJ, Craig WY et al. Association between serum insulin growth factor-I (IGF-I) and a simple sequence repeat in IGF-I gene: implications for genetic studies of bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2286-90.
15. McCarthy TL, Ji C, Shu H, Casaghi S, Crothers K, Rotwein P et al. 17 β estradiol potentially suppresses cAMP-induced IGF-I gene activation in primary rat osteoblast cultures. *J Biol Chem* 1997;272:18132-9.
16. West CA, Arnett TR, Farrow SM. Expression of IGF-I mRNA variants in rat bone. *Bone* 1996;19:41-6.
17. Naylor LH, Clark EM. d(TG)n:d(CA)n sequences upstream of the rat prolactin gene form Z-DNA and inhibit gene transcription. *Nucleic Acids Res* 1990;18:1595-600.
18. Kato I, Eastham J, Li B, Smith M, Yu H. Genotype-phenotype analysis for the polymorphic CA repeat in the insulin-like growth factor-I (IGF-I) gene. *Eur J Epidemiol* 2003;18: 203-9.
19. Miyao M, Hosoi T, Inoue S, Hoshino S, Shiraki M, Orimo H et al. Polymorphism of insulin-like growth factor I gene and bone mineral density. *Calcif Tissue Int* 1998;63:306-11.
20. Takacs I, Koller DL, Peacock M, Christian JC, Hui SL, Conneally PM et al. Sibling pair linkage and association studies between bone mineral density and the insulin like growth factor I gene locus. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:4467-71.
21. Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 1993;75:73-82.