

hVDR 原核表达及其与重金属镉、铅的结合活性

焦健^{1,2}, 张照斌^{2*}, 胡建英², 王金水¹

(1. 河南工业大学粮油食品学院, 郑州 450052; 2. 北京大学城市与环境学院, 北京 100871)

摘要:人类维生素 D 受体 (hVDR) 是重金属影响骨骼代谢的潜在受体通道, 但目前没有重金属影响 hVDR 通道的报道. 通过构建含有 hVDR 的 pGEX-4T-1 表达质粒, 建立了原核表达具生物学活性的 hVDR 的方法; 然后根据核受体与其配体结合后可以与核受体转录激活因子 2 (Transcriptional intermediary factor 2, TIF2)-细菌碱性磷酸酶 (bacterial alkaline phosphatase, BAP) 融合蛋白 (TIF2-BAP) 结合, 建立了研究化学物质影响 hVDR 与核受体转录激活因子结合活性的磷酸对硝基苯酚法. 通过该方法研究发现, 镉 (CdCl₂) 或铅 (PbAc₂) 均能提高 hVDR 与 TIF2-BAP 的非配体依赖性结合. 当加入 100 μmol/L 和 1 000 μmol/L 氯化镉 (CdCl₂) 后, 结合活力分别显著上升至对照组的 3.95 和 4.39 倍 ($p < 0.05$); 加入 100 μmol/L 和 1 000 μmol/L 醋酸铅 (PbAc₂) 后, 结合活力分别显著上升至对照组的 2.29 和 3.52 倍 ($p < 0.05$). 这表明镉和铅可能通过干扰 hVDR 受体通道的正常功能导致骨代谢异常和骨质疏松症的发生.

关键词:人维生素 D 受体; 原核表达; 重金属; 结合效应; 镉; 铅; 骨代谢

中图分类号: X18 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)10-2469-06

Prokaryotic Expression of Human Vitamin D Receptor (hVDR) and Its Binding Activities to Cd and Pb

JIAO Jian^{1,2}, ZHANG Zhao-bin², HU Jian-ying², WANG Jin-shui¹

(1. School of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450052, China; 2. College of Urban and Environmental Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: Human vitamin D receptor (hVDR) is a potential receptor channel for heavy metals to affect bone metabolism, while to date there is no report about the binding activity between heavy metals and hVDR. This study established a prokaryotic expression of hVDR system, by cloned hVDR-LBD into pGEX-4T-1 vector. Then according to the principle that the nuclear receptor binding with its ligand can be combined with nuclear receptor coactivator 2-bacterial alkaline phosphatase fusion protein (TIF2-BAP), we established a method of *p*-nitrophenylphosphate-alkaline phosphatase to analyse the effects of chemical on the binding activity between hVDR and TIF2-BAP. Using this method, we studied the binding activities between hVDR and TIF2-BAP after exposure of cadmium and lead. The results showed that the binding activities significantly increased to 3.95 and 4.39 times that of the control after exposure of 100 μmol/L and 1 000 μmol/L cadmium chloride (CdCl₂), and the binding activities significantly increased to 2.29 and 3.52 times that of the control after exposure of 100 μmol/L and 1 000 μmol/L lead acetate (PbAc₂), respectively. These results indicate that cadmium and lead can mimic the activity of 1,25-(OH)₂D₃, disrupt the normal function of hVDR receptor channel, which may be the underlying mechanism of abnormal bone metabolism and osteoporosis caused by cadmium and lead.

Key words: human vitamin D receptor (hVDR); prokaryotic expression; heavy metals; combining effect; cadmium; lead; bone metabolism

目前, 重金属的污染已成为影响人类健康的重要因素. 许多疾病的高发被怀疑与重金属污染有关, 但是其分子机制却并不清楚. 镉和铅是 2 种重要的重金属污染元素, 可以导致多种人体疾病, 其中由其引起的佝偻病、软骨病、骨质疏松症、骨骼畸形和骨骼代谢异常是最受关注的公共健康问题之一. 20 世纪八大公害之一的“痛痛病”就是由于长期食用被镉污染的大米而引起的, 该病典型生理学特点之一便是骨密度降低引起骨质疏松. 最近, 全球各国的大量流行病学调查进一步证明了镉、铅污染的增加与骨密度的降低存在显著的相关性^[1]. 为了模拟和证实人体暴露镉引起的流行病效应, Brzoska 等^[2,3]

开展了饮水添加镉暴露老鼠实验, 发现长期暴露 1 mg/L 镉就可以导致老鼠腰椎骨质疏松症、骨质软化、硬度降低、骨骼代谢异常等. 同样, 对铅污染与骨密度的流行病学调查也得出了相似结论, 发现长期从事接触铅的工作也可以导致骨密度明显降低, 接触铅的时间与骨钙密度值呈显著负相关^[4]. 世界卫生组织的大量调查和实验也证实了铅会降低骨钙含量并影响骨骼发育^[5].

收稿日期: 2009-11-24; 修订日期: 2010-01-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20877003, 20837003)

作者简介: 焦健 (1984~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为粮食、油脂与植物蛋白工程, E-mail: jiaojian1111@yahoo.com.cn

* 通讯联系人, E-mail: zhangzb@pku.edu.cn

以前,一般认为镉和铅导致骨质疏松症、骨骼代谢异常等疾病的原因是由于其在肾脏皮质中的大量贮存,降低了肾脏中负责将 25-羟基维生素 D (25-OHD₃) 催化为活性维生素 D [1,25-(OH)₂D₃, 或称骨化三醇] 的肾 1 α 羟化酶活性,使 1,25-(OH)₂D₃ 生成减少,血液中 1,25-(OH)₂D₃ 浓度降低,从而引起成骨细胞活性下降,产生的基质减少,使骨量降低,最终导致骨质疏松症发生^[4,6]。最近,Engstrom 等^[7]通过酶联免疫分析了不同镉暴露水平绝经妇女的血液 1,25-(OH)₂D₃ 浓度,否定了镉通过影响血液 1,25-(OH)₂D₃ 水平导致骨质疏松的说法。他们的研究发现,尽管镉与骨密度等相关骨骼指标存在显著相关性,但是镉污染水平与血液 1,25-(OH)₂D₃ 浓度没有显著相关性,且血液 1,25-(OH)₂D₃ 浓度与骨骼指标也没有相关性。这样镉、铅导致骨质疏松和骨骼代谢异常的机制仍不清楚,有待进一步研究。鉴于一些研究表明,镉可以与含羟基、氨基、巯基的蛋白质分子结合,从而抑制许多酶的活性^[8]。而 1,25-(OH)₂D₃ 发挥生理功能的通道是维生素 D 受体 (VDR)^[9],也是含羟基、氨基、巯基的蛋白质。且有研究表明 hVDR 与肠道钙吸收、骨质代谢相关^[10-14]。因此建立体外研究 hVDR 受体活性的方法,开展重金属与 hVDR 的受体结合活性分析,对于阐明镉、铅导致骨质疏松和骨骼代谢异常的机制具有重要的意义。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 质粒、细胞株

质粒 pGEX-4T-1、菌株 *E. coli* DH₅ 购自北京鼎国生物技术有限公司。含有重组质粒 PET_{28a}-TIF2-BAP 的 BL-21 菌株获赠于日本大阪大学药学院西川淳一教授。

1.1.2 主要试剂

二甲基亚砜,卡那霉素,氨苄青霉素,IPTG,溶菌酶 Lysozyme,显色剂 (*p*-nitrophenylphosphoric acid, NPP),还原型谷胱甘肽,DTT,Nonidet P-40 (reagent grade),EDTA (Biotechnology Grade),Tween 20 (Biotechnology Grade) 均购自美国 Amresco 公司;亲和吸附填料 Glutathione Sepharose 4B 购自瑞典 Amersham 公司,Ni-NTA agarose 购自 Qiagen 公司;酵母提取物,胰蛋白酶购自英国 Oxoid 公司,Pyrobest DNA 聚合酶、*Xho* I、*Eco*R I、T₄ DNA 连接酶以及 DNA 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购

自 TaKaRa 公司;1,25-(OH)₂D₃ 购自南京康满林化工实业有限公司;氯化镉、醋酸铅购自上海亭新制药厂。

1.1.3 测试样品的配制

1,25-(OH)₂D₃ 先用异丙醇配成终浓度为 0.1 mol/L 的储备液,然后按照 10 倍稀释的方法用 DMSO 稀释 7 个梯度。氯化镉、醋酸铅用去离子水配成 0.1 mol/L 的储备液,然后按照 10 倍稀释的方法用去离子水梯度稀释。

1.2 方 法

1.2.1 pGEX-4T-1 VDR-LBD 表达载体的构建

利用 Trizol 法提取 Caco-2 细胞总 RNA,反转录得到 cDNA,根据目的载体的酶切位点分别设计引物,上游: 5'-CCC~~CGA~~ATTTCGATTCGAAGGAGT-TCATTCTGACAGATGA-3',下划线为 *Eco*R I 酶切位点;下游: 5'-CGATAAAGCTTGATTTTCAGGAGATCT-CATTGCCAA-3',下划线为 *Hind* III 酶切位点。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 共 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。回收 PCR 产物,用 *Eco*R I 和 *Hind* III 酶切 VDR-LBD 片段, TaKaRa 胶回收试剂盒回收酶切后产物。再用 T₄ DNA 连接酶连接 VDR-LBD 和 pGEX-4T-1,转化至 DH₅ α 感受态大肠杆菌中。

1.2.2 GST-VDR-LBD、TIF2-BAP 重组蛋白的表达及纯化

从转化平板上挑取单菌落,接入 20 mL 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素 (PET_{28a}-TIF2-BAP 菌用 25 μ g/mL 卡那霉素) LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 260 r/min 培养过夜,按 2% 的比例转接到新鲜的 LB 培养基。37 $^{\circ}$ C 培养至对数生长期 (*D*₅₉₅ 为 0.4~0.6),加入 1 mmol/L IPTG 诱导表达。3h 后, 4 $^{\circ}$ C 3 600 r/min 离心 10 min,收集菌体。菌体用 30 mL B₁ 缓冲液 (20 mmol/L Tris (pH 7.5), 10% glycerol, 0.1 mol/L KCl, 5 mmol/L MgCl₂) 重悬, -80 $^{\circ}$ C 冷冻 8 h,加 1 mg/mL 溶菌酶冰上消化 20 min,冰浴超声破碎后转移到三角瓶中,并加入 0.05 mol/L KCl,冰浴搅拌 30 min。4 $^{\circ}$ C, 9 000 r/min 离心 20 min,收集上清。用 sepharose 4B 分离纯化 GST-VDR-LBD 蛋白;用 Ni-agarose 分离纯化 TIF2-BAP 蛋白。所得蛋白经 SDS-PAGE 电泳分析,确认纯化效果后 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3 受体结合测试实验

参照 Kanayama 等^[15]开发的磷酸对硝基苯酚法活力测试系统的方法,取 0.3 mg GST-VDR-LBD 蛋白溶于 10 mL 冰冷的 0.1 mol/L NaHCO₃ (pH =

8.4) 溶液中,加入预冷的 96 孔酶标板上,每孔加入 100 μL 4°C 放置 8 h. 用 200 μL 的缓冲液 A-DTT(先加 20 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L KCl, 0.25 mmol/L EDTA, 5% Glycerol, 调节 pH 为 7.4, 然后加 0.05% Tween 20, 形成缓冲液 A, 配制 1 mol/L DTT, 用前混合使其最终浓度为 0.5 mmol/L, 形成 A-DTT 缓冲溶液)清洗 3 次. 每孔加入 100 μL TIF2-BAP 溶液(3 μg TIF2-BAP 溶于冰冷缓冲液 A-DTT 中), 每孔加入 1 μL 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ DMSO 溶液或氯化镉、醋酸铅待测试样品 4°C 放置 60 min. 用 180 μL 冰冷的缓冲液 B(先加 50 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L KCl, 5 mmol/L MgCl $_2$, 调节 pH 为 7.2, 然后加 0.1% Nonidet P-40)清洗 3 次. 每孔加入 100 μL 显色缓冲液[在 1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)中加入 NPP, 使其最终浓度为 10 mmol/L, 轻轻混匀], 37°C 放置 60 min. 加入 25 μL 0.25 mol/L NaOH 终止反应, 在酶标仪上 405 nm 波长测定吸光度值.

1.2.4 统计分析

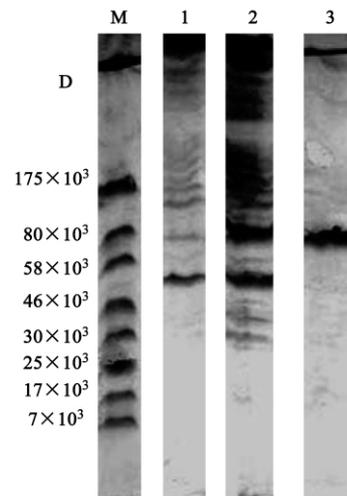
采用 SPSS 软件(Ver11.5; Chicago, IL, USA) one-way ANOVA, Tukey 多重比较来检验相关数据的差异, 当 $p < 0.05$ 时认为差异显著, 所有数据和图表均以平均值 \pm 标准偏差表示.

2 结果与讨论

2.1 受体结合活性方法建立

(1) GST-hVDR 重组蛋白的表达与纯化 电泳结果表明, 经过 IPTG 诱导后, GST-hVDR-LBD 蛋白明显表达. 如图 1 所示, 在第 2 泳道相对分子质量 $58 \times 10^3 \sim 80 \times 10^3$ 处出现明显的诱导蛋白条带, 与设计的相对分子质量为 62×10^3 GST-hVDR 重组蛋白相吻合. 经 sepharose 4B 柱分离纯化后, 得到单一的经诱导后出现的蛋白条带(图 1 第 3 泳道), 表明本研究建立的含有 VDR-LBD 插入片段的 pGEX-4T-1 表达载体转染大肠杆菌后可以成功表达 GST-hVDR 蛋白, 并且可以经过 sepharose 4B 柱很好分离纯化.

(2) hVDR 结合活性的磷酸对硝基苯酚法 在人类或动物机体内, 核受体 VDR 是 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ 发挥生物学活性的通道, VDR 与 1,25-(OH) $_2$ D $_3$ 结合后形成受体配体复合物, 进而能够与转录共激活因子结合, 从而可以结合 RNA 聚合酶 II 启动 VDR 调控目标基因的转录. 因此, 受体配体复合物与转录共激活因子的结合能力被认为是反映 VDR 启动基因转录活性的重要指标. 本研究正是基于这个原理,



M. 蛋白质分子量 Marker;

1. 未诱导的 BL21/pGEX-4T-1-hVDR-LBD 裂解物;
2. IPTG 诱导 3 h 的 BL21/pGEX-4T-1-hVDR-LBD 裂解物;
3. 纯化后 hVDR-LBD 融合蛋白

图 1 大肠杆菌表达的 GST-hVDR 重组蛋白及柱纯化后的电泳图

Fig. 1 SDS-PAGE result of recombinant protein pGEX-4T-1-hVDR-LBD after purification

参照 Kanayama 等^[15]开发的 CoA-BAP 测试系统, 选用核受体转录共激活因子 TIF2, 建立测定化学物质与 hVDR 结合活性的磷酸对硝基苯酚法. 在该方法中, TIF2 蛋白的 C 末端连接碱性磷酸酯酶(BAP), 形成 TIF2-BAP 融合蛋白. 而 BAP 能够将显色剂 NPP(*p*-Nitrophenylphosphate)的磷酸基团切去, 变为黄色的 *p*-Nitrophenol, 在酶标板 405nm 波长下可测定. 因而配体的 VDR 结合活性同显色强度有着相关关系, 从而可以利用显色强度表征化学物质与 VDR 的结合活性(见图 2).

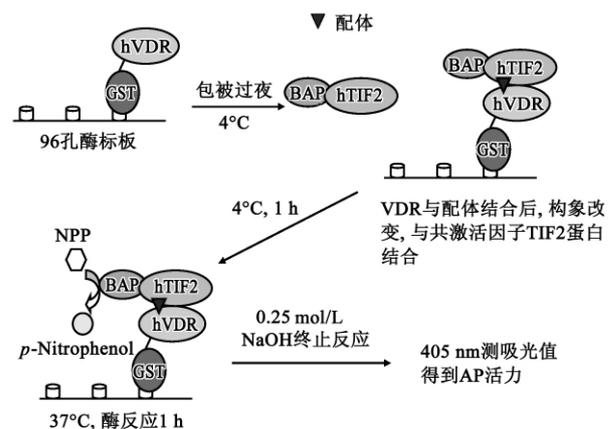
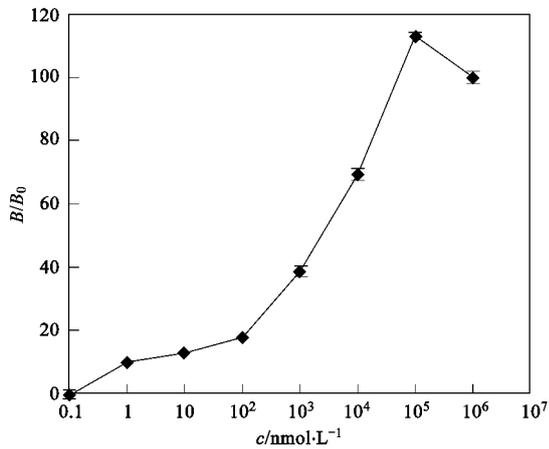


图 2 hVDR 受体与 TIF2 结合显色反应流程示意

Fig. 2 Scheme of screening method for hVDR ligands

本实验采用上述方法,开展 $1,25-(OH)_2D_3$ 与 hVDR-LBD 的结合实验,发现随着 $1,25-(OH)_2D_3$ 浓度的改变,405 nm 光吸收值相应升高,且 $1,25-(OH)_2D_3$ 在 1 nmol 水平时,光吸收值就有明显升高,说明该方法灵敏有效(图 3).



B : $1,25-(OH)_2D_3$ 相应浓度下与受体 VDR 的结合活力;

B_0 : $1,25-(OH)_2D_3$ 最大测试浓度 (10^6 nmol/L) 时与受体 VDR 的结合活力; B/B_0 : 相对活力

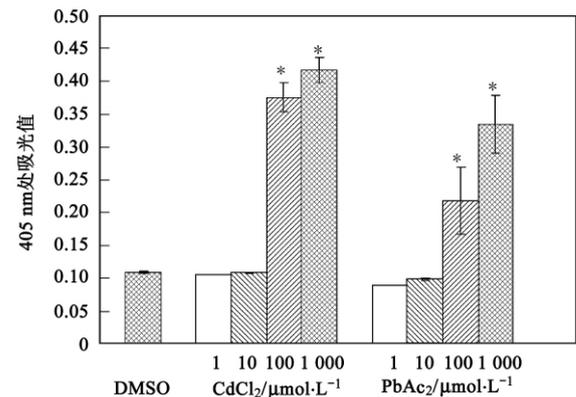
图 3 $1,25-(OH)_2D_3$ 与受体 hVDR 的结合曲线

Fig. 3 Binding curve of $1,25-(OH)_2D_3$ and hVDR

2.2 重组蛋白 hVDR-LBD 与镉、铅的结合活性

利用上述方法进行氯化镉 ($CdCl_2$)、醋酸铅 ($PbAc_2$) 的暴露实验.当加入浓度为 100 $\mu mol/L$ 和 1 000 $\mu mol/L$ $CdCl_2$ 时,光吸收值显著升高 ($p < 0.05$),分别达到对照组 (DMSO) 的 3.95 和 4.39 倍.当加入 100 $\mu mol/L$ 和 1 000 $\mu mol/L$ $PbAc_2$ 时,结合活力同样显著升高 ($p < 0.05$),分别达到对照组 (DMSO) 的 2.29 倍和 3.52 倍(图 4).由此可见镉、铅的存在对 hVDR 的构象造成了明显影响.在浓度达到一定程度后,其可以使 hVDR 在没有 $1,25-(OH)_2D_3$ 存在情况下与核受体共激活因子 TIF2 结合,获得开启下游基因表达的活性,从而扰乱 VDR 的正常通道功能,进而干扰受 hVDR 通道调控的骨骼代谢等生理活动.这与以前一些有关 $CdCl_2$ 、 $PbAc_2$ 与雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 和雄激素受体 (androgen receptor, AR) 结合的报道结果相似. Wilson 等^[16]通过克隆雌激素受体反应元件 (estrogen-responsive elements, ERE) 到人乳腺癌 T47D 细胞,体外构建了基于荧光素酶报告基因的雌激素受体-配体结合实验系统,发现重金属镉在 0.1 $\mu mol/L$ 及更高浓度时就具有类雌激素作用,而且当

加入 1 $\mu mol/L$ 雌激素受体拮抗剂 ICI-162780 时,结合效应完全被抑制,因此认为重金属是通过与雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 结合调控相关基因的转录产生雌性化效应. Martin 等^[17]开展的重金属与雄激素受体 (androgen receptor, AR) 结合实验也得到类似结果,他们发现在浓度达到 0.01 $\mu mol/L$ 时能够完全干扰雄激素双氢睾酮 (DHT) 与 AR 的正常结合.鉴于 ER、AR 与 VDR 都属于核受体超家族,结构和分子功能上具有很多相似性,因此本研究的结果应该是准确可靠的.



$n = 6$, 平均值 \pm 标准偏差

图 4 重金属 $CdCl_2$ 、 $PbAc_2$ 与 VDR 结合效应

Fig. 4 Dose-response curves of $CdCl_2$ or $PbAc_2$ for VDR

一些研究发现,重金属可以与含羟基、氨基、巯基的酶结合,从而抑制许多酶的活性^[8]. Nesatyy 等^[18]对重金属与雌激素受体的结合研究也得到类似与酶结合的结果,发现重金属与受体蛋白的结合本质是依靠重金属与氨基酸侧链的受体蛋白分子表面的羟基、氨基、巯基结合,其中最主要依靠存在于受体分子蛋白表面的含半胱氨酸的螺旋,而结合活力的大小主要取决于半胱氨酸的巯基与重金属的结合.通过对 hVDR 基因 (NCBI LOCUS: AY342401) 编码氨基酸序列的分析,笔者发现 hVDR 含有大量具有羟基、氨基和巯基侧链氨基酸,其中侧链含羟基氨基酸有 53 个 (丝氨酸 45 个,酪氨酸 8 个),侧链含氨基氨基酸有 82 个 (天冬酰胺 13 个,谷氨酰胺 16 个,精氨酸 29 个,赖氨酸 24 个),含巯基氨基酸有 17 个 (半胱氨酸 17 个),占总氨基酸个数的 35.8%.这说明重金属与 hVDR 分子的结合可能和重金属与雌激素受体的结合方式相同,也是通过结合分子表面氨基酸侧链,引起的分子构象变化,从而可以与 TIF2 结合.将 $CdCl_2$ 和 $PbAc_2$ 的影响进行比

较在相同的浓度下,CdCl₂与hVDR的结合要比PbAc₂与hVDR的结合活性弱(图4),这种结合活力的差异可能与Cd、Pb与受体的结合构象有关.从重金属配位化学的角度Cd、Pb与蛋白结合时的构象是不同的,Pb离子在与半胱氨酸的配位基-巯基硫结合时倾向于形成三角锥体结构,Cd离子在结合时则倾向于形成四面体结构,而后者更为稳定^[19].

目前重金属导致佝偻病、骨质疏松症等疾病已经被大量流行病学调查和动物实验证实^[1-5].对其可能原因有2种主要解释:第一种是以前被普遍接受的观点,认为重金属在肾外皮细胞堆积导致肾损伤,降低了1 α 羟化酶活性的活性,从而使得25-OHD₃向1,25-(OH)₂D₃转化受阻,血浆中1,25-(OH)₂D₃浓度过低,进而降低了肾小管对钙磷重吸收,导致钙磷吸收失衡,从而导致病症的发生^[2,6],但这种说法最近被Engstrom^[7]等的研究结果否定,他们发现重金属导致骨骼疾病的发生与血浆中的1,25-(OH)₂D₃水平无关,在重金属暴露后血浆中的1,25-(OH)₂D₃浓度基本没有变化,提出可能存在其他的机制.第二种原因是基于细胞水平的,发现重金属直接提高了破骨细胞的活性,引起骨基质吸收异常增高,从而导致骨骼疾病的发生^[20-22],但是这种说法目前还没有信号通道机制的研究证据支持.本研究正好填补这一空白.因为以前有研究表明,VDR的天然配体1,25-(OH)₂D₃具有促进破骨细胞形成及活性增强的作用^[23],而本研究发现hVDR与重金属结合后正是展现出配体结合后的活性状态,也就是Cd、Pb重金属模拟1,25-(OH)₂D₃活性,这样就从受体通道的角度解释了重金属影响破骨细胞活性的原因,从而使重金属导致佝偻病、骨质疏松症等骨骼代谢异常疾病的机制更加系统和完整.

3 结论

(1) 建立了VDR-LBD的原核表达方法和研究hVDR结合活性物质扰乱hVDR受体通道的体外方法.

(2) 发现镉(CdCl₂)和铅(PbAc₂)均在100 μ mol/L及更高浓度水平时能显著提高hVDR与TIF2-BAP的非配体依赖性结合,从而影响正常的hVDR调控功能;认为镉、铅可以与hVDR结合,导致hVDR与核受体转录共激活因子结合,获得转录活性,引起破骨细胞数量和活性增加,最终造成骨质疏松等骨骼代谢异常的相关疾病.

参考文献:

- [1] Bhattacharyya M H. Cadmium osteotoxicity in experimental animals: Mechanisms and relationship to human exposures [J]. *Toxicol Appl Pharm*, 2009, **238**(3):258-265.
- [2] Brzoska M M, Moniuszko-Jakoniuk J. Low-level exposure to cadmium during the lifetime increases the risk of osteoporosis and fractures of the lumbar spine in the elderly: studies on a rat model of human environmental exposure [J]. *Toxicol Sci*, 2004, **82**:468-477.
- [3] Brzoska M M, Moniuszko-Jakoniuk J. Low-level lifetime exposure to cadmium decreases skeletal mineralization and enhances bone loss in aged rats [J]. *Bone*, 2004, **35**(5):1180-1191.
- [4] 冯青,谭亮英,李田菊,等.接触铅工人骨密度与接铅工龄、血铅、血钙关系的研究[J]. *中国职业医学*, 2007, **34**(4):289-291.
- [5] Kanis J A, Alexeeva L, Bonjour J P, et al. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis—synopsis of a WHO report [J]. *Osteoporosis Int*, 1994, **4**(6):368-381.
- [6] Kjellstrom T. Mechanism and epidemiology of bone effects of cadmium [J]. *IARC Sci Publ*, 1992, **118**:301-310.
- [7] Engstrom A, Skerving S, Lidfeldt J, et al. Cadmium-induced bone effect is not mediated via low serum 1,25-dihydroxyvitamin D [J]. *Environ Res*, 2009, **109**:188-192.
- [8] Volesky B, Holan Z R. Biosorption of heavy-metals [J]. *Biotechnol Progr*, 1995, **11**(3):235-250.
- [9] DeLuca H F. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D [J]. *Am J Clin Nutr*, 2004, **80**(6):1689-1696.
- [10] Haussler M R, Whitfield G K, Haussler C A, et al. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed [J]. *J Bone Miner Res*, 1998, **13**:325-349.
- [11] Uitterlinden A G, Pols H A, Burger H, et al. A large-scale population-based study of the association of vitamin D receptor gene polymorphisms with bone mineral density [J]. *J Bone Miner Res*, 1996, **11**:1241-1248.
- [12] 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]. *J Bone Miner Res*, 1997, **12**:915-921.
- [13] Yoshizawa T, Handa Y, Uematsu Y. Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning [J]. *Nat Genet*, 1997, **16**(4):391-396.
- [14] Amling M, Priemel M, Timothy H, et al. Rescue of the skeletal phenotype of vitamin D receptor-ablated mice in the setting of normal mineral ion homeostasis: formal histomorphometric and biomechanical analyses [J]. *Endocrinology*, 1999, **140**(11):4982-4987.
- [15] Kanayama T, Mamiya S, Nishihara T, et al. Basis of a high-throughput method for nuclear receptor ligands [J]. *J Biochem*, 2003, **133**(6):791-797.

- [16] Wilson V S , Bobseine K , Gray L E. Development and characterization of a cell line that stably expresses an estrogen-responsive luciferase reporter for the detection of estrogen receptor agonist and antagonists [J]. *Toxicol Sci* ,2004 ,**81**:69-77.
- [17] Martin M , Voeller H , Gelmann E , *et al.* Role of cadmium in the regulation of AR gene expression and activity [J]. *Endocrinology* ,2002 ,**143**(1) :263-275.
- [18] Nesatyy V J , Rutishauser B V , Eggen R I , *et al.* Identification of the estrogen receptor Cd-binding sites by chemical modification [J]. *Analyst* ,2005 ,**130**:1087-1097.
- [19] Matzapetakis M , Ghosh D , Weng T C , *et al.* Peptidic models for the binding of Pb(II) , Bi(III) and Cd(II) to mononuclear thiolate binding sites [J]. *J Biol Inorg Chem* ,2006 ,**11**:876-890.
- [20] Allison K W , Elizabeth A C , Smith B D , *et al.* Effects of cadmium on osteoclast formation and activity in vitro [J]. *Toxicol Appl Pharm* ,1996 ,**140** (2) :451-460.
- [21] Wilson A K , Bhattacharyya M H. Effects of cadmium on bone: an in vivo model for the early response [J]. *Toxicol Appl Pharm* ,1997 ,**145**:68-73.
- [22] Uriu K , Morimoto I , Kai K , *et al.* Uncoupling between bone formation and resorption in ovariectomized rats with chronic cadmium exposure [J]. *Toxicol Appl Pharm* ,2000 ,**164**:264-272.
- [23] Takeda S , Yoshizawa T , Nagai Y , *et al.* Stimulation of osteoclast formation by 1 ,25-dihydroxy vitamin D requires its binding to vitamin D receptor (VDR) in osteoblastic cells: Studies using VDR knockout mice [J]. *Endocrinology* ,1999 ,**140** (2) :1005-1008.