

# 한국 요석 환자의 Eta-1/Osteopontin 유전자 다형성 분석

## Eta-1/Osteopontin Genetic Polymorphism is Associated with Urolithiasis in Koreans

Tae-Hyoung Kim, Seo Yeon Lee, Woo Hyun Chung, Seung Young Oh, Young Tae Moon, Kyung Do Kim, Young Sun Kim, Mi-Kyung Lee<sup>1</sup>, Hye Ryouon Kim<sup>1</sup>, Soon Chul Myung

From the Departments of Urology and <sup>1</sup>Laboratory Medicine, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul, Korea

**Purpose:** Osteopontin (OPN) is one of the major non-collagenous bone matrix proteins produced by osteoblasts and osteoclasts, and it is also involved in the pathogenesis of urolithiasis. Single nucleotide polymorphisms (SNPs), as a tool for searching for the genetic markers of disease, have a large role in investigating the genetic markers of complex human diseases. The aim of this study is to investigate the association with this SNP at position nucleotide 9250 (C→T) in the OPN gene and the susceptibility to urolithiasis. We also compared the allele frequency of Koreans with those of Americans and Japanese.

**Materials and Methods:** A total of 161 urolithiasis patients and 104 healthy controls were studied. The SNPs located at position 9250 in the OPN gene were genotyped using restriction fragment length polymorphism (RFLP). The wild-type sequence contains a C while the polymorphism variant is a T (C→T), which results in the appearance of an Alu I restriction site.

**Results:** The gene frequencies of C/C, C/T and T/T at position 9250 on the Eta-1/osteopontin gene in urolithiasis patients were 10.6%, 36.6% and 52.8%, respectively, compared with 6.7%, 27.9% and 65.8%, respectively, in the controls ( $p > 0.05$ ). The allele frequencies of C and T at this position in the urolithiasis patients were 28.9 and 72.1, respectively, whereas those in the controls were 20.7 and 79.3, respectively, ( $p < 0.05$ ). The allele frequencies found in the present study were compared with those coding SNPs described in the USA database; 60 and 39 (USA) vs 20.7 and 79.3 (Korea), respectively ( $p < 0.05$ ).

**Conclusions:** Those findings suggest there is no association of with Eta-1/osteopontin genetic polymorphism, but the allele frequencies were significantly associated with urolithiasis patients. We also observed difference of allele frequencies in our controls and in the USA controls and these differences may be caused by a difference in the incidence of urolithiasis patients between the two countries. (**Korean J Urol 2008;49:55-59**)

**Key Words:** Eta-1/osteopontin, Urolithiasis, Polymorphism

대한비뇨기과학회지  
제 49 권 제 1 호 2008

중앙대학교 의과대학 비뇨기과학교실,  
<sup>1</sup>진단검사의학교실

김태형 · 이소연 · 정우현 · 오승영  
문영태 · 김경도 · 김영선  
이미경<sup>1</sup> · 김혜련<sup>1</sup> · 명순철

접수일자 : 2007년 9월 18일  
채택일자 : 2007년 10월 8일

교신저자: 명순철  
중앙대학교병원 비뇨기과  
서울시 동작구 흑석동 224-1  
☎ 156-861  
TEL: 02-299-1808  
FAX: 02-797-3471  
E-mail: uromyung@yahoo.co.kr

## 서 론

요석은 비뇨기과 질환 중 가장 흔한 질환의 하나로 빈도는 약 0.1-0.3%, 유병률은 5-10%이며, 유전적인 요인과 기후, 식이 습관, 지역 등의 환경적 요인에 따라 발생의 차이를 보이고, 그 중 수산칼슘 (calcium oxalate)석은 약 70%로

많은 부분을 차지하고 있다.<sup>1</sup> 최근 비타민 D 수용체, E-cadherin, urokinase 유전자 등의 단일 뉴클레오타이드 다형성과 요석의 연관성에 대한 다양한 연구가 시도되고 있다.<sup>2</sup> 골모세포와 파골세포에서 생성하는 비콜라겐 단백질 중 하나인 osteopontin (OPN)은 조직치유, 염증, 면역에서 중요한 역할을 하는 시토카인으로, 자가면역질환이나 만성염증질환 등에서 발현이 증가되어 있고, 칼슘석이 있는 쥐의 신장

에서도 유전자 발현이 현저하게 증가되어 있다는 보고가 있다.<sup>3</sup> OPN 유전자의 발현에 영향을 주는 원인 중 하나로 단일 뉴클레오타이드 다형성을 생각할 수 있고 이에 대한 보고들이 있다. 그 중 OPN 유전자 early T-lymphocyte activation 1 (Eta-1)/osteopontin (SPP1)은 골, 손상을 받은 신장 조직과 T 세포에서 발현되는 것으로 알려져 있고, 골 형성 뿐 아니라 탐식구 화학 주성이나 면역 세포의 기능 항진 등에 영향을 미친다는 보고도 있다.<sup>4</sup> 특히 자가면역질환인 전신홍반루푸스에서 시행한 코드화 부위 엑손 6과 7 다형성 연구에서 엑손 7의 뉴클레오타이드 9250 (C→T)과 전신홍반루푸스 질환 사이의 연관성이 보고되었다.<sup>4</sup> 요석환자에서 OPN 유전자 다형성 분석은 유일하게 Gao 등<sup>5</sup>에 의해 연구되었고 OPN 유전자 뉴클레오타이드 9402 위치 다형성 발생이 요석환자에서 의미 있게 증가되어 요석 질환의 위험도를 예측할 수 있는 유전적 표지자로 사용 가능하다고 보고하였다.

이에 본 연구에서는 탐식구의 이동, 염증반응 등이 요석 형성에 중요함에 착안하여 OPN 유전자 엑손 7 뉴클레오타이드 9250 (C→T) 위치의 다형성을 분석하여 다형성이 요석 환자를 예견하는 유전적 표지자로 사용될 수 있을지 또는 발병기전이나 특징적인 임상 증상에 영향을 주는지 여부를 알아보고자 한다. 또한 정상 한국인에서의 OPN 유전자 엑손 7 뉴클레오타이드 9250 위치 다형성 빈도를 서구, 일본의 보고와 비교하여 보고자 하였다.

**대상 및 방법**

**1. 대상**

2006년 10월부터 2007년 3월 사이에 본원 비뇨기과에 내원하여 배설성요로조영술, 초음파, 전산화단층촬영 등 영상 검사에서 요석으로 확진된 환자 161명을 대상으로 하였다. 대조군은 건강진단센터를 방문한 사람 중 요검사 소견이 정상이며 초음파로 요석이 없음이 확인되고 문진상 요석력이 전혀 없는 지원자 104명을 대상으로 하였다. 요석환자군은 남자 108예, 여자 53예였으며, 평균연령은 50.7±13.5년 (20-79세), 대조군은 남자 74예, 여자 30예였으며 평균 연령은 55.8±20.7년 (14-84세)이었다. 본 연구는 중앙대학교 생명윤리심의위원회 심의를 통과하여 진행하였다.

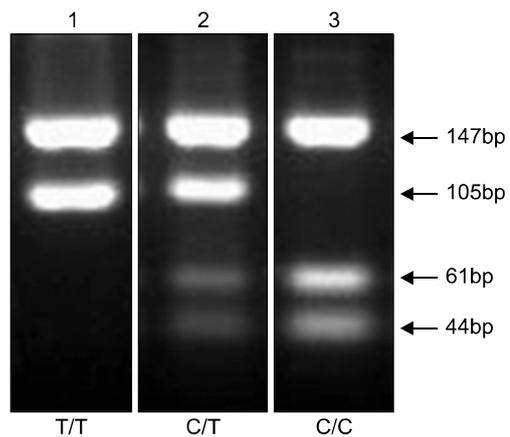
**2. 방법**

**1) DNA 추출:** EDTA가 항응고제로 들어있는 전혈 500 μl 를 lysis buffer (0.32M sucrose, 10mM Tris-HCL, pH 7.5, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton-X 100)를 이용하여 혼합과 원심분리 (13,000rpm에서 30초, 3회 반복)한 후, proteinase K (Boeh-

ringer Mannheim, Mannheim, Germany)를 포함한 완충액 (10mM Tris HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 0.1mg/ml gelatin, 0.45% NP40, 0.45% Tween 20)을 첨가하여 55°C에서 1시간 반응시키고, proteinase K를 변성시키기 위해 95°C에서 10분간 처리하여 template DNA를 얻었다.

**2) Eta-1/osteopontin C→T 다형성 검사:** 추출한 DNA를 Forton의 방법에 따라 상류시발체 (5'-TACCCCTGATGCTA-CAGACGAGG-3')와 하류시발체 (5'-CTGACTATCAATCA-CATCGGAATG-3')를 이용하여 중합연쇄반응을 시켰다. 야생형 염기서열은 C를 다형성의 변이는 T를 가지고 있으며 다형성이 있는 경우에 Alu I 절단부위에 노출되게 된다. 이와 같은 다형성 변이가 있는 경우 Alu I 제한효소 절단 위치가 나타나고 절단되게 된다. 요석환자군과 대조군에서 모두 Alu I 제한 효소 처리를 한 후 각각의 증폭산물은 3% 아가로오스 겔에서 100V로 60분간 전기영동한 후 브롬화 에티딴 (ethidium bromide, EtBr)으로 염색하여 Image system (ChemiDoc XRS system, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)으로 분절의 유무와 크기를 확인하였다. 분절의 크기는 147-과 105 염기 분절 그리고 다시 61-과 44 염기의 분절이 생성되었다 (Fig. 1). 요석환자군과 대조군에 따른 유전자형과 대립유전자의 빈도는 Epi Info 2005 (version 3.3.2)를 사용하여 chi-square 분석으로 비교하였다.

**3) 검사실 소견의 비교:** 요석 환자는 처음 내원 당시 검사로 일반혈액검사, 전해질 검사, 요검사를 실시하였고 24시간 요대사 검사를 시행하였다. 요대사검사는 기상 직후 첫



**Fig. 1.** Representative agarose gel electrophoresis illustrating the restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) products for the Eta-1/osteopontin gene polymorphism. The nt 9250 polymorphism in exon 7: lane 1, homozygous T/T subject; lane 2, heterozygous C/T subject; lane 3, homozygous C/C subject. C allele cut with Alu I, which generated 147- and 105-bp fragments and the T allele cut with Alu I generated 61- and 44-bp fragments.

소변을 버리고 다음날 첫 소변까지를 톨루엔 3ml를 넣은 전용용기에 수집하였으며 요량과 나트륨, 인, 요산, 칼슘, 마그네슘, 수산, 구연산 등을 측정하였다. 이상의 검사실 소견을 유전형과 대립유전자형에 따라 차이가 있는지 알아보았다. 통계학적 분석은 SPSS (ver.12.0) 프로그램을 사용하였고 Student's t-test를 이용하여 p값이 0.05 미만인 경우를 유의한 것으로 간주하였다.

**결 과**

**1. 유전형 빈도**

요석환자군에서 Eta-1/osteopontin 유전자의 뉴클레오타이드 9250 위치의 다형성은 C/C 17명 (10.6%), C/T 59명 (36.6%), T/T 85명 (52.8%)으로 나타났으며, 104명의 정상 대조군은 각각 7명 (6.7%), 29명 (27.9%), 그리고 68명 (65.8%)으로 두 군 사이의 유의한 차이는 보이지 않았다 (Table 1). 이때 각 군에서의 유전자형 분포는 일정한 조건 하에서는 한 개체군 간의 대립유전자 빈도가 같고 유전자의 빈도는 대를 거듭하여도 일정하다는 Hardy-Weinberg equilibrium에 의한 기대치와 유의한 차이는 없었다 (www.husdyr.kvl.dk/htm/kc/).

**Table 1.** Gene and allele frequencies at nt 9250 of the Eta-1/osteopontin gene in the urolithiasis patients and the healthy controls

|                  | Urolithiasis patients (%) (n=161) | Control (%) (n=104) | p-value |
|------------------|-----------------------------------|---------------------|---------|
| Gene frequency   |                                   |                     |         |
| T/T              | 85 (52.8)                         | 68 (65.8)           | >0.05   |
| C/T              | 59 (36.6)                         | 29 (27.9)           | >0.05   |
| C/C              | 17 (10.6)                         | 7 (6.7)             | >0.05   |
| Allele frequency |                                   |                     |         |
| T                | 229 (72.1)                        | 165 (79.3)          | <0.05   |
| C                | 93 (28.9)                         | 43 (20.7)           | <0.05   |

**2. 대립유전자 빈도**

Eta-1/osteopontin 유전자의 뉴클레오타이드 9250 위치의 대립유전자 C와 T의 빈도는 요석환자군 161명에서 각각 0.28과 0.72, 대조군 104명에서는 각각 0.21과 0.79로 나타나 두 군 간에 의미 있는 차이를 보였다 (p=0.03,  $\chi^2=4.46$ , odds ratio=0.64) (Table 1).

**3. 유전자형과 검사실 소견**

요석환자군에서 Eta-1/osteopontin 유전자의 뉴클레오타이드 9250 위치의 유전형에 따른 검사실 소견의 평균값을 비교한 결과 세 군 간의 유의한 차이는 보이지 않았다 (Table 2).

**4. 대립유전자 빈도 비교**

Eta-1/osteopontin 유전자 뉴클레오타이드 9250 위치의 대립유전자 C와 T의 빈도는 한국의 정상인에서 0.21과 0.79로 나타나 미국 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 데이터베이스의 0.61과 0.39와는 유의한 차이가 있었다 (p=0.03,  $\chi^2=4.46$ , odds ratio=0.64).

**고 찰**

OPN은 정상적으로 신장의 요세관고리와 원위관에 주로 존재하다가 신장 손상을 받았을 때 사구체와 요관에 증가 되는 유전자로 탐식구의 축적을 증가시켜 탐식구 매개 신장 손상을 유발시키는 역할도 하고 급성 허혈에 대한 내성을 증가시키고 NO<sup>-</sup>의 합성을 감소시키는 등 신손상을 방어 해주는 역할도 하는 것으로 알려져 있다.<sup>6,7</sup> 요석에서의 OPN 역할도 결석을 억제한다는 보고가 있는 반면 증진시킨다는 보고도 있어 아직 논란의 대상이다. 소변에 있는 OPN인 uropontin이 수산화 결정의 성장과 응집을 감소시키고 신상피세포에 결합을 방해하여 calcium oxalate mono-

**Table 2.** Laboratory findings in urolithiasis patients according to the gene variation at nucleotide 9250 on the Eta-1/osteopontin gene

| Category   | Gene at nt 9250 on Eta-1/osteopontin |             |             | Overall p-value |
|------------|--------------------------------------|-------------|-------------|-----------------|
|            | C/C                                  | C/T         | T/T         |                 |
| uNa        | 199±79                               | 215±121     | 219±117     | NS              |
| uCa        | 163±83                               | 172±105     | 173±85      | NS              |
| Citrate    | 363±270                              | 398±245     | 393±276     | NS              |
| Oxalate    | 31.4±24.4                            | 28.4±18.3   | 27.6±18.1   | NS              |
| Urine vol. | 2,150±831                            | 2,578±1,321 | 2,820±1,534 | NS              |

NS: not significant, Normal range: urine Na (0-200mEq), urine Ca (0-250mg), citrate (>320mg), oxalate (0-45mg), urine volume (>2,000ml).

hydrate (COM)의 응집과 성장을 억제하며 또한 신상피세포에 결합력이 떨어지는 calcium oxalate dihydrate (COD) 형성을 도와 요석의 형성을 저해하나,<sup>8-11</sup> 반대로 OPN 유전자가 있으면 수산화칼슘 결정이 Madin-Darby canine kidney (MDCK) 세포에 더 많이 유착되어 결석 형성을 증진시킨다는 보고도 있다.<sup>12</sup> 따라서 동일한 유전자가 다양한 기능을 보일 수 있는 경우는 유전자에 양적 또는 구조적인 이상이 발생하여 질환을 유발하는 것으로 생각할 수 있으며 그 중 하나로 다형성의 발생을 생각할 수 있다. 이에 요석환자에서 OPN 유전자 9402와 9171 뉴클레오타이드의 다형성을 연구하여 그 중 9402 위치의 다형성이 요석환자에서 의미 있게 증가하였다고 보고하였고 이는 단백질의 변화를 가져오지는 않으나 OPN 유전자 기능의 변화를 초래하여 개인의 요석에 대한 민감도를 높여 질환 유발이 된다고 생각하였다.<sup>5</sup> 결정은 또한 간질성 기질과 간질 세포의 수를 증가시켜 국소 자극과 염증 반응을 유발하며 여기서 발생하는 염증반응이 요석 형성의 중요한 요소이고 이 염증반응의 초기 과정에 탐식구의 침습이나 간질성 결정의 제거 등이 중요한 것으로 알려져 있다.<sup>13,14</sup>

OPN 유전자 다형성은 연구에 의하면 13개가 알려져 있고 그 중 코딩 부위에 있는 9250 위치의 T/T 유전형이 전신 홍반루푸스 환자에서 의미 있게 증가되었는데, 자가면역질환에서 OPN이 탐식구를 이동시켜 면역과 염증 반응을 증가하여 질환의 병태생리에 관여한다고 생각된다.<sup>4</sup> 본 연구에서도 요석 형성에 탐식구의 이동, 염증반응 등이 영향이 중요하므로 9250 위치의 다형성을 분석하여 보았으나 요석환자군과 대조군 간의 C/C, C/T, T/T 유전형의 차이는 발견할 수 없었으나 이를 각각 C와 T로 나누어 분류한 대립유전자는 대조군에 비하여 요석환자군에서 T대립유전자의 빈도가 의미 있게 감소되어 있었다. 이는 요석 환자 161명과 대조군 104명을 가지고 시행한 결과로 좀 더 많은 수의 환자군과 대조군을 가지고 연구를 한다면 9250 위치에서의 대립유전자만의 차이가 아닌 유전형에 따른 유의한 차이도 발견될 가능성도 배제할 수는 없다고 생각한다. 각각의 유전형에 따른 24시간 요중 나트륨, 칼슘, 수산, 구연산 및 요량 등의 검사실 결과를 비교해 보았으나 유의한 차이를 발견할 수는 없었다.

요석 유병률을 살펴보면, 미국인은 8%로 한국인의 3.5%보다 높은 것으로 알려져 있다.<sup>15,16</sup> 본 연구에서 대조군 104명을 분석한 정상 한국인의 대립유전자 C와 T 빈도는 0.21과 0.79는 미국의 0.61과 0.39와는 유의한 차이가 있었고, 일본의 0.30과 0.70과는 유사하여 인종 및 대륙 간의 차이를 보인다.<sup>17</sup> 이러한 대립유전자의 차이는 인종 및 대륙 간 요석에 대한 민감도 차이를 보여 한국인과 미국인의 요석 유

병률이 다르게 나타날 수 있는 유전적 원인 중의 하나일 것으로 유추할 수 있으며, 더 많은 수를 포함시킨 연구가 필요할 것으로 생각한다. 유전자는 여러 가지 가족력을 보이는 질환에서 연구되고 있으며 이 중 뉴클레오타이드의 치환 등에 대한 연구 결과들이 많이 축적되고 있다. 요석은 약 30%에서 가족력을 보인다고 하며 그 외의 환경적인 요인에 대한 반응에서도 이러한 유전적 요인을 배제할 수는 없으리라 생각된다.<sup>18</sup> 본 연구에서는 OPN 유전자 중 Eta-1/osteopontin 위치의 다형성을 분석하였으나 요석환자군을 수산화칼슘결석, 요산결석, 인산칼슘 등으로 세분화하여 분석하지 못하였고 환자군과 대조군에서 소변 내의 uropontin 치를 측정하지 못하여 유전형에 따른 uropontin 치의 차이를 분석하지 못하였다. 또한 다형성 분석을 위해서는 좀 더 많은 수의 환자군과 대조군을 포함시킨 분석이 절실히 필요하며 이미 요석환자군에서 다형성 차이를 보인 뉴클레오타이드 9402 위치와 함께 시행하여 두 유전자 간의 연관불균형 여부에 관한 카이제곱 검정도 필요하다고 생각한다. 이상으로 요석이 탐식구의 이동과 염증반응과 관련이 있고, OPN 유전자의 뉴클레오타이드 9250 위치 다형성이 이와 관련이 있어 앞으로 좀 더 세분화시키고 많은 수의 환자군을 포함한 연구를 시행하면 요석의 병태생리에서 Eta-1/osteopontin 유전자의 역할과 선행요인의 유전자 표지자로 사용 여부를 평가할 수 있을 것으로 생각한다.

## 결 론

최근 자가면역질환에서 OPN이 탐식구를 이동시켜 면역과 염증 반응을 증가하여 질환의 병태생리에 관여한다고 생각되고 있는 Eta-1/osteopontin 유전자에 대하여 다형성 분석을 실시하여 요석환자군과 대조군에서 유전형의 차이는 없었으나 대립유전자의 차이를 발견할 수 있었다. 또한 대조군의 대립유전자 빈도를 비교해 본 결과 일본과는 유사한 결과를, 미국과는 상반된 결과를 보였다. 이는 유전형에 차이에 의해서 요석 유병률의 차이를 보일 가능성이 있다는 사실을 시사한다.

## REFERENCES

1. Leusmann DB, Blaschke R, Schmandt W. Results of 5,035 stone analysis: a contribution to epidemiology of urinary stone disease. *Scand J Urol Nephrol* 1990;24:205-10
2. Watts RW. Idiopathic urinary stone disease: possible polygenic aetiological factors. *QJM* 2005;98:241-6
3. Xie Y, Sakatsume M, Nishi S, Narita I, Arakawa M, Gejyo F. Expression, roles, receptors, and regulation of osteopontin

- in the kidney. *Kidney Int* 2001;60:1645-57
4. Forton AC, Petri MA, Goldman D, Sullivan KE. An osteopontin (SPP1) polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus. *Hum Mutat* 2002;19:459
  5. Gao B, Yasui T, Okada A, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. A polymorphism of the osteopontin gene is related to urinary calcium stones. *J Urol* 2005;174:1472-6
  6. Lopez CA, Hoyer JR, Wilson PD, Waterhouse P, Denhardt DT. Heterogeneity of osteopontin expression among nephrons in mouse kidneys and enhanced expression in sclerotic glomeruli. *Lab Invest* 1993;69:355-63
  7. Noiri E, Dickman K, Miller F, Romanov G, Romanov VI, Shaw R, et al. Reduced tolerance to acute renal ischemia in mice with a targeted disruption of the osteopontin gene. *Kidney Int* 1999;56:74-82
  8. Asplin JR, Arsenault D, Parks JH, Coe FL, Hoyer JR. Contribution of human uropontin to inhibition of calcium oxalate crystallization. *Kidney Int* 1998;53:194-9
  9. Lieske JC, Leonard R, Toback FG. Adhesion of calcium oxalate monohydrate crystals to renal epithelial cells is inhibited by specific anions. *Am J Physiol* 1995;268:F604-12
  10. Worcester EM, Beshensky AM. Osteopontin inhibits nucleation of calcium oxalate crystals. *Ann NY Acad Sci* 1995;760:375-7
  11. Wesson JA, Worcester EM, Wiessner JH, Mandel NS, Kleinman JG. Control of calcium oxalate crystal structure and cell adherence by urinary macromolecules. *Kidney Int* 1998;53:952-7
  12. Yamate T, Kohri K, Umekawa T, Amasaki N, Amasaki N, Isikawa Y, et al. The effect of osteopontin on the adhesion of calcium oxalate crystals to Madin-Darby canine kidney cells. *Eur Urol* 1996;30:388-93
  13. de Water R, Boeve ER, van Miert PP, Vermaire CP, van Run PR, Cao LC, et al. Pathological and immunocytochemical changes in chronic calcium oxalate nephrolithiasis in the rat. *Scanning Microsc* 1996;10:577-87
  14. de Water R, Leenen PJ, Noordermeer C, Nigg AL, Houtsmuller AB, Kok DJ, et al. Cytokine production induced by binding and processing of calcium oxalate crystals in cultured macrophages. *Am J Kidney Dis* 2001;38:331-8
  15. Kim H, Jo MK, Kwak C, Park SK, Yoo KY, Kang D, et al. Prevalence and epidemiologic characteristics of urolithiasis in Seoul, Korea. *Urology* 2002;59:517-21
  16. Curhan GC, Rimm EB, Willett WC, Stampfer MJ. Regional variation in nephrolithiasis incidence and prevalence among United States men. *J Urol* 1994;151:838-41
  17. Iwasaki H, Shinohara Y, Ezura Y, Ishida R, Kodaira M, Kajita M, et al. Thirteen single-nucleotide polymorphisms in the human osteopontin gene identified by sequencing of the entire gene in Japanese individuals. *J Hum Genet* 2001;46:544-6
  18. Scheinman SJ. Nephrolithiasis. *Semin Nephrol* 1999;19:381-8