

한국인 폐경 후 여성에서 에스트로젠 수용체 유전자 다형성 및 뇨중 에스트로젠 대사물과 골밀도와의 상관성

연세대학교 의과대학 내과학교실, 한국과학기술원 도핑컨트롤센터*

이지현 · 임승길 · 원영준 · 권석호 · 차봉수 · 송영득 · 이현철 · 허갑범 · 정봉철*

Estrogen Receptor Gene Polymorphism, Urinary Estrogen Metabolites and Bone Mineral Density in Korean Postmenopausal Women

Ji Hyun Lee, M.D., Sung Kil Lim, M.D., Young Jun Won, M.D., Seok Ho Kwon, M.D.,
Bong Soo Cha, M.D., Young Duk Song, M.D., Hyun Chul Lee, M.D.,
Kap Bum Huh, M.D. and Bong Chul Jung, Ph.D.*

*Department of Internal Medicine, Yonsei University, College of Medicine
Doping Control Center, Korea Institute of Science and Technology**

ABSTRACT

Background: Estrogen status is important for maintaining the homeostasis of bone. Estrogen has direct effects on bone cells, through binding to the high-affinity estrogen receptor. Several recent studies suggest that there might be genetically determined variations in biosynthesis and function of estrogen receptor in postmenopausal osteoporosis. Also the main cause of postmenopausal osteoporosis is decreased level of serum estrogen, whereas there had been some suggestion that the remaining estrogen have some effect on bone metabolism after menopause. We investigated the relationship between estrogen receptor gene PvuII polymorphism and bone mineral density(BMD), and the relationship between 18 urinary metabolites of estrogen and BMD in Korean postmenopausal osteoporosis.

Methods: We examined the PvuII polymorphism of the estrogen receptor gene in 5' upstream region and the first intron by restriction fragment length polymorphism analysis in 62 postmenopausal women. BMD was measured by DEXA. The urinary estrogen metabolites were determined by GC/MS(Gas Chromatography-Mass Spectrometry) at Korean Institute of Science and Technology Doping Control Center.

Results: BMD of the spine and the femoral neck correlated with body weight, height, body mass index as we expected. There was no polymorphism of PvuII restriction site on 5' upstream region

* 본 논문은 1995년도 연세대학교 의과대학 강사연구비 및 1996년도 보건복지부 지원으로 이루어 졌음.

of estrogen receptor gene. Whereas the prevalence of the PP, Pp, pp genotype in the first intron of estrogen receptor was 12.9%, 45.2%, 41.9%, respectively. But, there was no correlation between PvuII genotype and the spine & femoral neck BMD. 2(OH)E₂ among 18 urinary metabolites of estrogen, showed a negative correlation with the spinal and femoral neck BMD($r=-0.2551$, $p<0.05$, and $r=-0.3341$, $p<0.01$, respectively), and the ratio of 16 α (OH)E₁/2(OH)E₁ revealed a positive correlation with the spinal BMD($r=0.3057$, $p<0.05$). In stepwise multiple regression analysis, body weight, 2(OH)E₂, 16 α (OH)E₁, 2(Meo)E₁ were independent predictors of the spinal bone density, and body weight and 2(OH)E₂ were independent predictors of the femoral neck bone density.

Conclusion: These results suggested that restriction fragment length polymorphism analysis of the estrogen receptor gene with PvuII restriction enzyme was not helpful for early detection of patients at risk of developing osteoporosis. However, the ratio of 16-hydroxylation to 2-hydroxylation of estrogen metabolism was reduced in postmenopausal women and high catecholesterogen formation might be a greater risk factor for osteoporosis (J Kor Soc Endocrinol 11:468~478, 1996).

Key Words: Estrogen receptor gene polymorphism, Estrogen metabolism, Bone mineral density, Postmenopausal women

서 론

에스트로젠은 골의 항상성을 유지하는데 있어서 매우 중요한 역할을 하는 호르몬이다[1]. 자연폐경으로 인한 에스트로젠 결핍 또는 수술에 따른 인위적인 폐경 시 골소실률이 증가된다[2~4]. 또한 폐경 후 10~20년 이 지난 여성에서의 골밀도가 단순히 연령에 따라 예측되는 골소실 보다 높은 것으로 보아, 폐경 직후 뿐만 아니라 폐경 후 오랜 기간 까지 잔여 여성호르몬 또는 안드로젠이 골대사에 미치는 영향이 중대함을 간접적으로 시사한다[5].

최대골량형성에 70~80%가 유전적인 소인에 의하여 결정되어 진다고 알려져 있지만[6], 아직 유전적 소인이 무엇인지는 명확히 밝혀지지 못하였다. 근자에 비타민 D 수용체 유전자 다형성과 골밀도간의 상관성에 대한 논란은 많은 연구자들에게 골다공증 발생의 유전적 소인에 깊은 관심을 갖는 계기가 되었으며, 유전적 소인의 규명은 단순한 학문적인 흥미뿐만 아니라 임상적으로도 중요하여 골다공증의 조기 예방 및 치료에 크게 도움이 될 것으로 사료된다.

Castagnoli 등[7]은 에스트로젠 수용체 유전자 첫번

째 intron 부위에서 PvuII 다형성이 존재함을 밝혀 내었고, 최근 Orimo 등은 에스트로젠 수용체 PvuII 다형성과 골밀도와 연관성이 있음을 보고하고 골다공증의 새로운 유전적인 원인 인자로 제시한바 있다[8].

한편 폐경 후 골다공증 발생은 혈중 에스트로젠 농도의 감소 이외에 폐경 후에도 안드로젠으로부터 전환된 에스트로젠의 양적인 결여 등에 의한 것으로 생각되고 있다[9]. 즉 폐경여성의 난소로부터 분비되는 에스트로젠의 양은 미비한 반면 부신 및 난소에서 분비되는 안드로젠은 지방조직에서 에스트론으로 전환되고 다시 말초 조직에서 수 많은 에스트로젠 대사물질로 전환되면서 생물학적 역할을 한다[10~12]. 그러나 아직 골다공증 환자들에서 정상인과 비교하여 에스트로젠 대사물 농도가 어떠한지에 관하여 연구된 바는 미비하다 [13].

이에 저자 등은 한국인 폐경 후 여성에서 에스트로젠 수용체 5' upstream 부위와 첫번째 intron 부위에서의 유전자 다형성의 존재여부를 조사하고, 유전자 다형성과 골밀도와의 상관성을 알아보려고 하였다. 더불어 뇨중 에스트로젠 대사물질들의 분석 및 농도를 측정하여 골밀도와의 연관성을 조사하고 대사물질의 활성도가 골밀도에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1. 대상 및 골밀도 측정

폐경 후 5년에서 10년된 여성으로서 대사성 및 내분비성 질환이 있거나 골대사에 영향을 미칠 수 있는 전신질환이 있는 여성은 제외하였고 칼슘, 에스트로젠 등 골밀도에 영향을 미치는 약물 복용의 과거력이 없는 62 명으로 하였다. 골밀도 측정은 Lunar 회사의 DEXA로 2,3,4번의 척추 및 대퇴경부의 골밀도를 측정하였다.

2. 에스트로젠 수용체 유전자 다형성 조사

1) DNA 추출 및 정제

대상자의 혈액 5mL를 EDTA tube에 수집하여 실온에서 2,000rpm으로 15분간 원심분리 한 후 buffy coat 층을 취하여 새로운 tube에 옮긴 후 추출 완충액(10mM Tris, PH 8.0, 0.1M EDTA, 0.5% SDS)를 넣고 37℃에서 1시간 동안 배양한다. 그리고 나서 proteinase K 50mL(100µg/mL Sigma USA)에 12시간 반응시켜 단백질을 분해 시킨 뒤, 동량의 페놀을 가하여 15분간 강하게 혼합한 후 4℃에서 3,500rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 얻는다. 이 상층액을 새로운 tube에 옮겨 담은 후 동량의 phenol/chloroform(chloroform:isoamyl alcohol(49:1)을 넣고 15분간 강하게 혼합하고 4℃에서 3,500rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 얻는다. 새로이 얻은 상층액을 새로운 tube에 옮겨 담은 후 다시 동량의 chloroform을 가하여 4℃에서 3,500rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 얻는다. 이 상층액을 새로운 tube에 옮겨 담은 후 1/10 용량의 3 M sodium acetate와 2배 용량의 99% ethanol을 가하여 DNA를 침전시킨후 75% ethanol로 세척하였다. 건조시킨 후 TE buffer(tris 10mM, 1mM EDTA PH 7.2)로 용해시켰다. 분리된 DNA는 분광광도계를 사용하여 260nm와 280nm에서 측정된 흡광도비(A260/280)가 1.7 이상임을 확인하였다.

2) PvuII 제한 효소 절단 및 전기영동

정제한 DNA를 증폭시키기 위하여 PCR 방법을 이

용하였다. 에스트로젠 수용체 5' upstream 부위를 증폭하기 위하여 senser primer GACCAGACCGACAAT-GTAAC와 antisenser primer CTTGTCGTCGCTGCT-GG를 이용하고, 첫번째 intron에서는 senser primer CTGCCACCCTATCTGTATC와 antisenser primer CTTTCTCTGCCACCCTGGCG를 이용하였다. 각각의 primer 20pmol에 dNTP set(각각 10mM), 10×PCR 반응액(50mM KCl, 1.25mM MgCl₂, 10.2mg/mL, 10 mM Tris, PH 8.4), MgCl₂ 25mM, Taq DNA polymerase(5000µ/mL, 0.25unit)를 첨가하고 총량이 30 µL가 되도록 증류수를 첨가하여 잘 섞은뒤 PCR 도중 반응액의 증발방지를 위하여 mineral oil 한방울을 증량하였다. PCR 혼합물을 DNA thermal cycler(Perkin Elmer Crtus, Norwalk, CT)를 이용하여 시작을 94℃에서 5분간 하여 1 cycle 활성을 도운 후, denaturation을 94℃에서 1분간 annealing을 57℃에서 1분간 extension을 72℃에서 1분 30초로 하여 35 cycle 시행한 뒤 extension을 72℃에서 5분간 하여 DNA 증폭의 활성을 도왔다. 각각의 PCR 산물을 2% agarose gel을 이용하여 764bp, 1.3Kb의 band를 확인하였다(Fig. 1, 2).

PCR 산물을 제한효소인 PvuII로 절단한 후 전기영동 분석을 하였다. PCR product 10 µL를 10×buffer 용액 2µL에 혼합한 후 PvuII 제한효소 1µL를 첨가하여 60℃에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 1.5% agarose gel에서 전기영동하고 0.5g/mL ethidium bromide로 30분간 염색한 후 Polaroid MP-4 camera(Clifton, NJ)를 이용하여 분리된 에스트로젠 수용체 유전자의 band를 확인하고 에스트로젠 수용체 유전자 다형성을 관찰하였다.

3. 뇨중 에스트로젠 대사를 측정

1) 뇨 시료 채취

뇨중 에스트로젠 대사물을 측정하기 위하여 뇨 시료 채취 전날 저녁 식사 후 금식한 뒤 검사 당일 첫 소변은 버리고 2시간 후(아침 8시부터 10시 사이)의 소변을 채취하였다. 채취된 뇨 시료는 에스트로젠 대사물을 분석하기 전까지 0.1 내지 0.2% ascorbid acid와 0.1%의 sodium azide로 처리한 후 -20℃에서 보관하였다.

Fig. 1. Genotype of estrogen receptor in 5' upstream. Lane 1, λ /Hind III size marker; Lane 2, PCR product(764bp); Lane 3, PvuII digested product

2) 뇨 시료 전처리 및 대사물 측정

뇨 시료 3mL를 원심분리한 후 내부표준물질인 d2-estradiol 0.5 μ g와 함께 충분히 세척된 Serodolit AD-2 resin에 흘려 준다. 흘려 준 뇨시료를 동량의 증류수로 씻어 준 다음 메탄올 1mL로 세차해 용출시킨다. 이후 메탄올을 증발시킨 후 0.2N acetate buffer 1mL와 Helix Pomatia에서 추출한 β -glucuronidase/arylsulfatase 50 μ L와 에스트로겐의 산화를 방지하기 위하여 1mg/mL의 ascorbid acid를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 가수분해 시킨다. 가수분해 후 potassium carbonate 100 mg을 가하여 pH를 9로 맞추고, ethylacetate 5mL로 추출한다. 에스트로젠을 추출한 후 GC/MS로 검출하기 위하여 N-methyl-N-trimethylsilyl-hep-tafluorobutylamide(MSTF)/Trimethylsilylchlorosilane(TMSCI) 100:1 혼합물 50 μ L를 가하고 60 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켜 유도체를 만들어 GC/MS에 2 μ L을 주입하여 에스트로젠 대사물 들을 측정하였다.

4. 통계처리

통계처리는 척추 및 대퇴경부의 골밀도와 신장, 체중 및 체질량지수와와의 관계는 피어슨 상관분석을 하였고,

Fig. 2. Genotype of estrogen receptor in the first intron. Lane 1, λ /Hind III size marker; Lane 2, PCR product(1300bp); Lane 3, PP type; Lane 4, Pp type; Lane 5, pp type.

에스트로젠 유전자 다형성에 따른 세군간의 척추 및 대퇴경부 골밀도의 비교는 ANOVA를 이용하였다. 에스트로젠 대사물과 골밀도와의 상관관계 분석은 피어슨 상관분석과 단계적 다중회기분석을 하였다. P 값이 0.05 이하인 경우에서 통계학적으로 유의하다고 하였으며, 모든 측정치는 평균 \pm 표준오차로 표시하였다.

결 과

1. 대상 환자들의 임상적 특징 및 신체 측정치와 골밀도간의 상관성

대상의 연령은 52~62세로 평균나이는 56.9세이었으며 폐경 후 나이는 6.6세, 평균 신장은 156.9cm, 체중은 58.0kg이었으며 체질량지수는 23.54kg/cm²이었다. 대상군의 척추 및 대퇴경부의 평균 골밀도는 각각 0.986, 0.812g/cm² 이었다(Table 1). 척추 및 대퇴경부의 골밀도와 신장, 체중 및 체질량지수와와의 상관관계는 척추 골밀도에서는 신장, 체중, 체질량지수와 r=0.3232 (p<0.01), r=0.4353(p<0.001), r=0.3164(p<0.05)로 양의 상관관계가 존재하였고 대퇴경부에서는 체중, 체질량지수와 r=0.3756(p<0.005), r=0.3451(p<0.01)로 양의 상관관계가 존재하여(Table 2) 이전의 다른 연구와 유사한 결과를 나타내었다.

2. 에스트로젠 수용체 유전자 다형성과 골밀도와의 관계

대상들의 PCR 산물을 PvuII 제한효소로 절단하여 에스트로젠 수용체 유전자 다형성을 조사하였다. 5' upstream 부위에서의 에스트로젠 수용체 유전자 다형성은 62 전 예에서 발견되지 않았다(Fig. 1). 한편 첫번째 intron에서는 PCR 산물을 PvuII 제한효소로 절단했을 때 3가지 genotype을 나타내었다. 즉 1300bp에만 하나의 band가 나타나는 PP형, 1300bp, 850bp, 450bp로 나타나는 Pp형 그리고 850bp, 450bp로 나타나는 pp형이 존재하였다(Fig. 2). 각각의 빈도는 12.9%, 45.2%,

41.9%이었으나 PvuII genotype과 척추 및 대퇴경부의 골밀도와는 상관관계는 존재하지 않았다(Table 3).

Table 1. Clinical Characteristics of Subject

Age(year)	56.9±0.26
YAM(year)	6.6±0.18
Height(cm)	156.9±0.81
Weight(kg)	58.0±0.49
BMI(kg/cm ²)	23.54±0.27
Spinal BMD(g/cm ²)	0.985±0.017
Femoral neck BMD(g/cm ²)	0.812±0.011

YAM; Years After Menopause, BMI; Body Mass Index, BMD; Bone Mineral Density Values are mean±SEM

Table 2. Correlation between Anthropometry and Spinal & Femoral neck BMD

	Spinal BMD		Femoral neck BMD	
	r	p-value	r	p-value
Height	0.3232	<0.01	0.2197	NS
Weight	0.4353	<0.001	0.3756	<0.005
BMI	0.3164	<0.05	0.3451	<0.01

Table 3. The Value of BMD According to the PvuII Genotype of Estrogen Receptor First Intron

	PP(n=8)	Pp(n=28)	pp(n=26)
Spinal BMD(g/cm ²)	0.961±0.033	1.013±0.032	0.976±0.033
Femoral neck BMD(g/cm ²)	0.824±0.032	0.820±0.019	0.789±0.019

Values are mean±SEM

Table 4. Estrogen Metabolites and Its Value

Estrogen metabolites/Cr	(nmol/g)	Estrogen metabolites/Cr	(nmol/g)
Estrone(E ₁)	12.5±32.02	6α-Hydroxy Estradiol	1.92±0.31
17β-Estradiol(E ₂)	9.14±1.36	4-MeO Estradiol	3.10±0.91
2-Methoxy Estrone	13.49±1.52	16,17-Epi Estriol	27.11±8.72
2-Hydroxy Estrone	23.72±6.54	16-Keto Estradiol	63.71±14.46
16α-Hydroxy Estrone	86.41±17.60	17-Epi Estriol	31.15±5.15
2-Hydroxy Estradiol	23.15±3.58	6-Keto Estradiol	5.93±0.86
Estriol(E ₃)	11.85±2.82	16-Epi Estriol	25.70±4.92
17α-Estradiol	6.03±1.67	6α-Hydroxy Estriol	95.39±25.91
6-Dehydro Estrone	12.00±1.48	2-MeO Estriol	8.72±1.22
		Total	365.67±51.71

Values are mean±SEM

Table 5. Correlation between Estrogen Metabolites and Spinal & Femoral neck BMD

	Spinal BMD		Femoral neck BMD	
	r	p-value	r	p-value
Estrone	0.0174	NS	0.0215	NS
17β Estradiol	-0.1102	NS	-0.0448	NS
2-Methoxy Estrone	-0.1803	NS	-0.1250	NS
2-Hydroxy Estrone	-0.0954	NS	-0.1656	NS
16α-Hydroxy Estrone	0.1390	NS	-0.0028	NS
2-Hydroxy Estradiol	-0.2551	<0.05	-0.3341	<0.01
Estriol	-0.1432	NS	-0.1469	NS
16α-Hydroxy Estrone				
/2-Hydroxy Estrone	0.3057	<0.05	0.1968	NS

Table 6. Regression Analysis of Bone Mineral Density.

Variables	Spinal BMD			Femoral BMD		
	R ² (%)	β	p-value	R ² (%)	β	p-value
Weight	18.9	0.44	0.0004	14.1	0.38	0.0026
2-Hydroxy Estradiol	24.6	-0.24	0.0393	24.3	-0.32	0.0065
16α-Hydroxy Estrone	31.1	0.28	0.0229			
2-Methoxy Estrone	36.0	-0.27	0.0419			

3. 뇨중 에스트로젠 대사물과 골밀도와의 상관성

GC/MS 방법으로 분석한 18개의 에스트로젠 대사물 들 각각의 양들은 다음과 같다(Table 4). 척추와 대퇴경 부의 골밀도와 에스트로젠 대사물과의 상관관계를 보 면 척추 골밀도는 2(OH)E₂와 음의 상관관계(r=-0.2551, p<0.05)를, 16α(OH)E₁/2(OH)E₁의 비율과는 양의 상 관관계(r=0.3057, p<0.05)를 보였다. 또한 대퇴경부의 골밀도는 2(OH)E₂와 음의 상관관계(r=-0.3341, p< 0.01)를 보였다(Table 5). 다중회기 분석에서는 체중, 2(OH)E₂, 16α(OH)E₁, 그리고 2-Meo(OH)E₁이 척추 골 밀도의 독립적인 결정인자이며, 체중과 2(OH)E₂가 대 퇴경부 골밀도의 독립적인 결정인자임을 나타내었다 (Table 6). 상기 결과로부터 2(OH)E₂의 생성의 증가와 16α(OH)E₁/2(OH)E₁의 비율의 감소가 골다공증의 독립 적인 위험인자가 될것으로 사료 되었다.

고 찰

골다공증은 골량의 감소 및 뼈의 미세구조의 변화로 인하여 조그만 충격에도 골절이 잘 발생하는 골대사질 환이다. 골량의 감소는 최대골량 형성의 부전 및 지속 되는 고골소실의 결과로서 나타난다. 즉 원발성 무월경 또는 사춘기가 늦게 시작한 여성에서는 적절한 최대 골 량이 형성되지 못하며, 자연폐경으로 인한 에스트로젠 결핍 또는 수술에 따른 인위적인 폐경시 골소실률이 증 가된다[2~4]. 또한 폐경 후 여성에서는 골량의 감소가 남성에 비해 5~10배 증가하고[14] 에스트로젠 수용체 유전자 결손을 보인 남성에서 골다공증이 초래되는 것 으로 보아[15], 에스트로젠이 최대골량 형성은 물론 폐 경 후 골소실에도 직접적으로 영향을 미치며 여성뿐만 아니라 남성에서도 여성호르몬이 중요하다는 것을 알 수 있다.

해면골과 피질골의 생물학적 활성도는 각기 달라서 해면골이 풍부한 척추가 대퇴골 및 요골보다 호르몬 및

유전적인 영향을 많이 받으며, 반대로 대퇴경부 및 요골의 골밀도는 환경적인 요인에 영향을 많이 받는다 [16,17]. 한편 유전적인 요소가 골대사에 미치는 영향에 대하여 많은 연구가 있어 왔다. 일란성 및 이란성 쌍둥이에서의 연구 결과에서 일란성 쌍둥이에서 이란성 쌍둥이 보다 골밀도간의 상관성이 높았고[6], 오스테오칼신과 c-펩타이드 프로콜라겐이 골밀도와 음의 상관관계가 존재함을 발견하였다[18,19]. 또한 Kelly 등[20]은 일란성 및 이란성 쌍둥이 간에 혈청 오스테오칼신치가 유의한 상관관계가 있는 것으로 보아 골량의 대한 유전적인 효과는 골전환과 관련이 있다고 하였다.

사람의 조골세포 및 파골세포에는 에스트로젠 수용체가 존재하며, 에스트로젠은 에스트로젠 수용체와 특이적으로 결합하여 조골세포와 파골세포의 기능을 조절함으로써 골의 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 한다[1]. 즉 에스트로젠은 조골세포의 에스트로젠 수용체와 결합하여 IL-6 유전자의 전사 및 전구파골세포에서의 IL-6 수용체의 전사를 억제하여 골흡수를 억제하며, 동시에 조골세포의 많은 유전자들의 전사 촉진 및 억제를 통하여 세포의 기질과 단백질 형성 및 골의 무기질화를 조절한다[21~23].

현재까지 밝혀진 에스트로젠 수용체 유전자의 구조는 7개의 intron 및 8개의 exon으로 구성되어 있으며 [24], 사람 에스트로젠 수용체 유전자 upstream 부위와 마우스 에스트로젠 수용체 유전자의 첫번째 intron과는 77%의 동질성이 존재하여 사람 에스트로젠 수용체 유전자 upstream 부위에 새로운 intron이 존재 할 가능성을 뒷받침 해주고 있다[25]. 한편 에스트로젠-에스트로젠수용체 결합체는 에스트로젠 조절 유전자의 활성화 부위에서 전사활성도를 조절하며, 유전자 발현 및 조절에 중요한 역할을 한다[26~29]. 5' upstream 부위는 에스트로젠 수용체의 전사활성도를 결정하는데 있어서 매우 중요한 부위여서 본 연구에서 조사한 사람의 에스트로젠 수용체 5' upstream PvuII 제한효소 절제 부위는 어쩌면 첫번째 intron일 가능성이 있다는 것을 시사하며 이 부위에서 유전자 다형성 여부를 조사하는 것은 임상적으로 큰 의미가 있을 것으로 사료된다. 더불어 intron에 존재하는 유전자 다형성은 exon의 변이와 연관이 있어 에스트로젠 수용체 단백질의 기능의 변화를

일으킬 것으로 사료되며 또 다른 intron이나 조절인자의 변이를 일으켜 전사조절을 통한 발현양상에 영향을 미칠 것으로 생각하고 있다. 결국 에스트로젠 수용체 유전자 다형성은 직접적으로 또는 또다른 유전자의 변이와 연관되어 간접적으로 골밀도에 영향을 줄 것으로 사료된다.

Castagnoli 등은 에스트로젠 수용체 유전자 첫번째 intron 부위에서 PvuII 유전자 다형성이 존재함을 밝혀 내었고[7], Orimo 등은 에스트로젠 수용체 첫번째 intron 부위의 PvuII 유전자 다형성과 골밀도와 연관성이 있음을 보고하였다[8]. Morrison 등도 첫번째 intron 부위에 PvuII 유전자 다형성을 발견하였지만, 골밀도와 상관성을 Orimo 등의 보고와는 상반되는 결과를 얻었다[30]. 본 연구 결과에서는 5' upstream 부위에서는 에스트로젠 수용체 유전자 다형성이 존재하지 않았으며 비록 첫번째 intron에서 다형성이 존재 하였지만 척추 및 대퇴골의 골밀도와 상관성이 없어 Orimo 등의 연구결과와는 상이하며 Morrison 및 한[31] 등이 보고한 결과와 비슷하였다. 그러나 한국인에서 에스트로젠 수용체 유전자 다형성과 골밀도간의 상관성이 발견되지 않은 이유는 확실치 않으며 좀더 많은 증례에서의 연구가 필요할 것으로 사료되었다.

폐경기 여성에서 폐경과 함께 감소하는 혈중 에스트로젠 농도의 감소가 골소실의 중요한 원인으로 알려져 있지만[32,33], 일부의 여성에서 일찍 골절역치에 이르는 원인에 대하여서는 아직 확실치 밝혀져 있지 않다. 또한 폐경 후에도 혈액내에 존재하는 잔류 에스트로젠이 골대사에 어느정도 역할을 하는지도 명확하지 않다 [10,11]. 한편 폐경 후 여성에서 난소로부터 분비되는 에스트로젠의 양은 미비한 반면 부신 및 난소에서 분비되는 안드로젠은 지방조직에서 aromatase에 의해 에스트론으로 전환되고 다시 말초조직에서 수 많은 에스트로젠 대사물질로 전환되면서 주된 혈중 에스트로젠을 형성하게 되고 생물학적 역할을 한다[10~12]. 그러나 아직 골다공증 환자들에서 에스트로젠 대사물질의 변화에 관하여 연구된 바는 미비하다[13].

안드로젠에서 전환된 에스트론의 대사과정은 2-hydroxylation 과정 및 16-hydroxylation 과정으로 나누어진다(Fig. 3). 뇨중 에스트로젠 대사물에서 임상적으

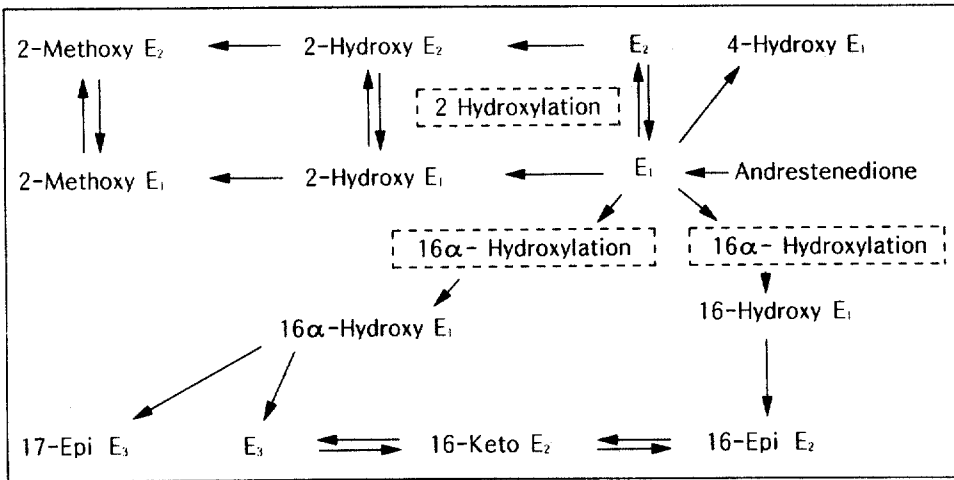


Fig. 3. Essential pathways of estrogen metabolism in humans.

로 의미가 있는 대사물은 2-hydroxylation 과정을 경유하여 비활성형 에스트로젠화된 대사물인 2-hydroxy Estrone, 2-hydroxy Estradiol, 2-meoxy Estrone 등과, 16-hydroxylation 과정을 통하여 비교적 활성도를 유지하는 에스트로젠 대사물인 16-hydroxy Estrone, Estradiol 등이 있다.

폐경 후 여성에서의 혈중 에스트로젠 농도는 지극히 적은 양이며 많은 간섭물질들이 존재하므로 인체내의 에스트로젠 분석과 그들의 대사과정에 대한 연구는 극히 높은 예민도를 갖는 기기에 의한 검출방법과 특별한 전처치가 필요하다. 폐경 후 여성에서 혈청 에스트로젠 측정은 일순간의 농도만을 반영하는 한계를 극복하기 위하여 본 연구에서는 노중 에스트로젠 대사물을 측정하였다. 노중 에스트로젠 대사물의 변화는 분비의 변화를 의미하는것이 아니라 대사의 변화를 의미하기 때문에 임상적으로 큰 의미를 지닐수 있다[34]. 또한 최근 고성능 정밀 기기들이 다양하게 개발되었고 이중에서도 질량분석기(gas chromatography-mass spectrometry)가 복잡한 내부간섭 물질을 포함하는 생체시료내에서 특정한 생체 물질을 분석하는데 많이 이용되고 있다 [35,36]. 또한 구조적으로 유사한 생체물질을 생체시료내에서 분석할 경우 각각을 정립화 및 특정화하는 것은 어려운 일이다. 그러나 질량분석기를 이용하면 같은 조건하에서 구조 및 화학적 성질 그리고 생화학적 대사과

정에서 연관성이 있는 생체물질들의 정량분석이 가능하다. 즉 질량분석기를 이용하여 한번의 시료처리로 여러개의 내인성 스테로이드 호르몬을 동시에 정량할 수 있으며 감도도 picogram 내지 nanogram 수준이고 각 호르몬의 특성이온, 분자량 및 상대적 머무름 시간으로 분리하기 때문에 생체시료내에 포함되어 있는 원하지 않는 간섭물질들을 배제할 수 있어서 현재 생체시료내 스테로이드 분석에는 가장 우수한 방법으로 알려져 있다[37].

본 연구에서는 질량분석기를 이용하여 노중 에스트로젠 대사물을 측정하고 척추 및 대퇴경부의 골밀도와 상관관계를 조사하여 보았다. 상관분석결과 척추 골밀도는 18개의 에스트로젠 대사물 중 2(OH)E₂와 음의 상관관계($r=-0.2551, p<0.05$)를, 16α(OH)E₁/2(OH)E₁의 비율과는 양의 상관관계($r=0.3057, p<0.05$)를 보였다. 대퇴경부 골밀도는 2(OH)E₂와 음의 상관관계($r=-0.3341, p<0.01$)를 보였다. 또한 단계적 다중회기 분석에서는 체중, 2(OH)E₂, 16α(OH)E₁, 그리고 2-Meo(OH)E₁이 척추 골밀도의 독립적인 결정인자이며, 대퇴경부 골밀도에서는 체중과 2(OH)E₂가 독립적인 결정인자로 나타났다. 이상의 결과로부터 폐경 후 여성에서도 체중이 골밀도에 영향을 미치는 주된 인자이지만, 2-hydroxylation 과정의 증가와 16α(OH)E₁/2(OH)E₁의 비율의 감소가 골다공증의 독립적인 위험인자가 됨을 알 수 있었

다. Hodge[13] 등은 뇨중 에스트라디올이 낮은 골밀도를 가진 폐경 후 여성에서 비활성화 대사물인 2-hydroxylation 대사물로의 전환이 많이 일어나며 이러한 대사가 폐경 초기의 골소실에 영향을 줄 것이라는 본 연구결과와 유사한 보고를 하였다.

이상의 결과로 보아 에스트로젠 수용체 유전자의 제한 부위 절단 효소인 PvuII로 절단되는 유전자 다형성은 골다공증으로 진행될 고위험군을 조기에 발견하는데에는 크게 도움이 되지 않으나, 폐경 후 여성에서 에스트로젠 대사물의 2-hydroxylation 과정의 증가와 16-hydroxylation 과정에 대한 2-hydroxylation 과정의 비율의 감소가 골밀도와의 상관성이 존재하여 고농도의 카테콜에스트로젠 형성이 골다공증의 위험인자가 될 것으로 사료되었다.

요 약

연구배경: 에스트로젠은 골의 항상성을 유지하는데 있어서 매우 중요한 역할을 하는 호르몬이다. 에스트로젠은 에스트로젠 수용체와 고결합력으로 결합한 후 조골세포에 직접적으로 작용을 하여 골의 무기질화와 재형성에 관여한다. 이전의 연구결과들은 폐경 후 골다공증 환자에서 에스트로젠 수용체의 생합성과 기능이 이미 유전적으로 결정되어져 있다고 보고하였다. 또한 폐경 후 골다공증의 주된 원인은 혈중 에스트로젠의 감소이지만 폐경 후에도 혈액내에 존재하는 잔류 에스트로젠이 골대사에 중요한 역할을 할 것이라고 생각하고 있다. 이에 저자 등은 한국인 폐경 후 여성에서 에스트로젠 수용체 유전자 PvuII 다형성의 존재 및 골밀도와의 상관성을 알아보고, 뇨중 에스트로젠 대사물과 골밀도와의 상관관계를 알아 보고자 하였다.

방법: 62명의 폐경 후 여성을 대상으로 에스트로젠 수용체 유전자의 5' upstream 부위 와 첫번째 intron에서 PvuII 다형성을 조사하였고 요추 및 대퇴경부의 골밀도는 DEXA로 측정하였다. 18개의 뇨중 에스트로젠 대사물은 한국과학기술원 도평콘트롤센터에 의뢰하여 GC/MS 방법으로 측정하였다.

결과: 척추 및 대퇴경부의 골밀도는 체중, 신장, 체질량지수와는 양의 상관관계를 보였다. 에스트로젠 수

용체의 5' upstream 부위에서는 PvuII 제한효소의 다형성 부위가 존재하지 않았다. 반면 첫번째 intron 부위에서의 다형성은 PP, Pp, pp genotype이 각각 12.9%, 45.2%, 41.9% 였으나, PvuII genotype과 척추 및 대퇴경부의 골밀도와는 상관관계는 없었다. 한편 18개의 뇨중 에스트로젠 대사물 중 2(OH)E₂은 척추 및 대퇴경부의 골밀도와 음의 상관관계를 보였다(p<0.05), 16α(OH)E₁/2(OH)E₁ 비율과 척추 골밀도와의 양의 상관관계를 보였다(p<0.05). 다중회기 분석에서는 체중, 2(OH)E₂, 16α(OH)E₁, 그리고 2-Meo(OH)E₁가 척추 골밀도의 독립적인 결정인자이며, 대퇴경부 골밀도에서는 체중과 2(OH)E₂가 독립적인 결정인자임을 나타내었다.

결론: 이상의 결과로 보아 에스트로젠 유전자의 제한 부위 절단 효소인 PvuII로 절단되는 유전자 다형성은 골다공증으로 진행될 고위험군을 조기에 발견하는데에는 크게 도움이 되지 않으나, 폐경 후 여성에서 에스트로젠 대사물의 2-hydroxylation 과정의 증가와 16-hydroxylation 과정에 대한 2-hydroxylation 과정의 비율의 감소가 골밀도와 상관성이 존재하여 고농도의 카테콜에스트로젠 형성이 골다공증의 위험인자가 될 것으로 사료되었다.

참 고 문 헌

1. Riis BJ, Rodbro P, Christiansen C: *The role of serum concentrations of sex steroids and bone turnover in the development and occurrence of postmenopausal osteoporosis. Calcif Tissue Int* 38:318-322, 1986
2. Dhuper S, Warren MP, Brooks-Gumm J, Fox R: *Effects of hormonal status on bone density in adolescent girls. J Clin Endocrinol Metab* 71: 1083-1088, 1990
3. Stepan JJ, Pospichal J, Presl J, Pacovsky V: *Bone loss and biochemical indices of bone remodeling in surgically induced postmenopausal women. Bone* 8:279-284, 1987
4. Civitelli R, Gonnelli S, Zacchei F, Bigazzi S,

- Vanthino A, Avioli LV, Gennari C: *Bone turnover in postmenopausal osteoporosis. J Clin Invest* 82:1268-1274, 1988
5. Kanis JA, Pitt FA: *Epidemiology of osteoporosis. Bone* 13(suppl):S10-15, 1992
 6. Slemenda CW, Christian JC, Williams CJ, Norton JA, Johnston CC Jr: *Genetic determinants of bone mass in adult women: a reevaluation of the twin model and the potential importance of gene interaction on heritability estimates. J Bone Miner Res* 6:561-567, 1991
 7. Castagnoli A, Maestri I, Bernardi F, Del Senno L: *PvuII RFLP inside the human estrogen receptor gene. Nucleic Acids Res* 15:866, 1987
 8. Kobayashi S, Inoue S, Hosoi T, Ouchi Y, Shiraki M, Orimo H: *Association of bone mineral density with polymorphisms of the estrogen receptor gene: J Bone Miner Res* 11:306-311, 1996
 9. Hawata H, Tanaka S, Takayana R, Sakai Y, Yanase T, Ikuyama S, Hajl M: *Aromatase in bone cell: association with osteoporosis in postmenopausal women. J Steroid Biochem Mol Biol* 53: 165-174, 1995
 10. Judd HL, Jude GE, Lucas WE, Yen SSC: *Endocrine function of the postmenopausal ovary: concentration of androgens and estrogens in ovarian and peripheral vein blood. J Clin Endocrinol Metab* 39:1020-1024, 1974
 11. Forney JP, Milewich L, Chen GT, Garlock JL, Schwarz B, Edman CD, MacDonald PC: *Aromatization of androstendione to estrone by human adipose tissue in vitro. Correlation with adipose tissue mass, age, and endometrial neoplasia. J Clin Endocrinol Metab* 53:192-199, 1981
 12. Adlercreutz H, Gorbach SL, Goldin BR, Woods MN, Dwyer JT, Hamalainen E: *Estrogen metabolism and excretion in Oriental and Caucasian women. J Natl Cancer Inst* 86:1076-1082, 1994
 13. Hodge J, Roodman-Weiss J, Lyss C, Wanger D, Klug T, Civitelli R: *Increased inactive estrogen metabolites in urine of early postmenopausal women with low bone density J Bone Miner Res* 10:S444, 1995
 14. Nilas L, Christiansen C: *Bone mass and its relationship to age at the menopause. J Clin Endocrinol Metab* 65:692-702, 1987
 15. Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, Korach KS: *Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. N Engl J Med* 331:1056-1061, 1994
 16. Pocock NA, Eisman JA, Hopper JL, Yeates MG, Sambrook PN, Ebert S: *Genetic determinants of bone mass in adults: a twin study. J Clin Invest* 80:706-710, 1987
 17. Nordin BEC, Need AG, Chatterton BE, Horowitz M, Morris HA: *The relative contributions of age and years since menopause to postmenopausal bone loss. J Clin Endocrinol Metab* 70:83-88, 1990
 18. Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA: *Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. Proc Natl Acad Sci USA* 89:6665-6669, 1992
 19. Garnero P, Arden N, Delmas PD, Spector TD: *Genetic effects in bone turnover. J Bone Miner Res(Suppl)* 9:S389, 1994
 20. Kelly PJ, Hopper JL, Macaskill GT, Pocock NA, Sambrook PN, Eisman JA: *Genetic factors in bone turnover. J Clin Endocrinol Metab* 72:808-813, 1991
 21. Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, Graham ML, Mann KG, Spelsberg TC, Riggs BL: *Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. Science* 241:84-86, 1988
 22. Komm BS, Terpening CM, Benz DJ, Graeme

- KA, Gallegos A, Korc M, Greene GL, OMalley BW, Haussler MR: *Estrogen binding, receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. Science* 241:81-84, 1988
23. Horowitz MC: *Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. Science* 260:626-627, 1993
24. Ponglikitmongkol M, Green S, Chambon P: *Genomic organization of the human oestrogen receptor gene. EMBO J* 7:3385-3388, 1988
25. White R, Lees JA, Needham M, Ham J, Parker M: *Structural organization and expression of the mouse estrogen receptor. Mol Endocrinol* 1:735-744, 1987
26. Dean DC, Gope R, Knoll BJ, Riser ME, OMalley BW: *A similar 5-flanking region is required for estrogen and progesterone induction of ovalbumin gene expression. J Biol Chem* 259:9967-9970, 1984
27. Jost JP, Geiser M, Seldran M: *Specific modulation of the transcription of cloned avian vitellogenin II gene by estradiol-receptor complex in vitro. Proc Natl Acad Sci USA* 82:988-991, 1985
28. Knowler JT, Beaumont JM: *The mechanisms of action of oestrogens. Essays Biochem* 20:1-39, 1985
29. Yamamoto KR: *Steroid receptor required transcription of specific genes and gene networks. Ann Rev Genet* 19:209-252, 1985
30. Oi JC, Morrison NA, Nguyen TV, White CP, Kelly PJ, Sambrook PN, Eisman JA: *Estrogen receptor genotypes and bone mineral density in women and men. J Bone Miner Res(Suppl)* 10: S170, 1995
31. 한기욱, 이혜숙, 문인걸, 임창훈, 김상우, 정호연, 한인권, 민현기: 폐경후 여성에서 에스트로젠 수용체 유전자의 이형성과 여성호르몬 치료전후의 골밀도 및 골대사 지표와의 연관관계. 대한골대사학회지 제 7차 추계학술대회 초록집:11, 1995
32. Genant HK, Cann CE, Ettinger BE, Gordan GS: *Quantitative computed tomography of vertebral spongiosa: a sensitive method for detecting early bone loss after oophorectomy. Ann Intern Med* 97:699-705, 1982
33. Krolner B, Pors NS: *Bone mineral content of the lumber spine in normal and osteoporotic women: cross sectional and longitudinal studies. Clin Sci* 62:329-336, 1982
34. Brown JB, Burlbrook RD, Greenwood FC: *An evaluation of a chemical method for the estimation of estradiol, estrone and estradiol-18 β in human urine. J Endocrinology* 16:41-48, 1957
35. Labadrios D, Moodie IM, Shephard GS: *Gas chromatographic analysis of amino acid in physiological fluids. J Chromatogr* 310:223-231, 1984
36. Heomaker JD, Elliott W: *Automated screening of urine samples for carbohydrates, organic and amino acid after treatment with urease. J Chromatogr* 562:125-138, 1991
37. Jellum E: *Profiling of human body fluids in healthy and diseased states using gas chromatography-mass spectrometry with special references to organic acids. J Chromatogr* 143:427-462, 1977