



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학박사 학위논문

한국 폐경여성에서 Wnt 길항물질계 유전자
다형성, 순환계내 osteoprotegerin,
receptor activator of NF- κ B ligand 및
골밀도의 연관성

**Relationship between polymorphisms of Wnt
antagonists genes, osteoprotegerin, receptor
activator of NF- κ B in circulating system and
bone mineral density in postmenopausal
Korean women**

2012년 8월

서울대학교대학원
의학과 산부인과학
이 동 옥

A thesis of the Doctor of Philosophy

**한국 폐경여성에서 Wnt 길항물질계 유전자
다형성, 순환계내 osteoprotegerin,
receptor activator of NF- κ B ligand 및
골밀도의 연관성**

**Relationship between polymorphisms of Wnt
antagonists genes, osteoprotegerin, receptor
activator of NF- κ B in circulating system and
bone mineral density in postmenopausal
Korean women**

August 2012

**The Department of Obstetrics and Gynecology,
Seoul National University
College of Medicine
Dong Ock Lee**

한국 폐경여성에서 Wnt 길항물질계 유전자
다형성, 순환계내 osteoprotegerin,
receptor activator of NF- κ B ligand 및
골밀도의 연관성

지도교수 김 정 구

이 논문을 의학박사 학위논문으로 제출함
2012년 4월

서울대학교 대학원
의학과 산부인과학 전공
이 동 옥

이동옥의 의학박사 학위논문을 인준함
2012년 6월

<u>위 원 장</u>	(인)
<u>부위원장</u>	(인)
<u>위 원</u>	(인)
<u>위 원</u>	(인)
<u>위 원</u>	(인)

학위논문 원문제공 서비스에 대한 동의서

본인의 학위논문에 대하여 서울대학교가 아래와 같이 학위논문 제공하는 것에 동의합니다.

1. 동의사항

- ① 본인의 논문을 보존이나 인터넷 등을 통한 온라인 서비스 목적으로 복제할 경우 저작물의 내용을 변경하지 않는 범위 내에서의 복제를 허용합니다.
- ② 본인의 논문을 디지털화하여 인터넷 등 정보통신망을 통한 논문의 일부 또는 전부의 복제·배포 및 전송 시 무료로 제공하는 것에 동의합니다.

2. 개인(저작자)의 의무

본 논문의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락하는 등 동의 내용을 변경하고자 할 때는 소속대학(원)에 공개의 유보 또는 해지를 즉시 통보하겠습니다.

3. 서울대학교의 의무

- ① 서울대학교는 본 논문을 외부에 제공할 경우 저작권 보호장치(DRM)를 사용하여야 합니다.
- ② 서울대학교는 본 논문에 대한 공개의 유보나 해지 신청 시 즉시 처리해야 합니다.

논문 제목 : 한국 폐경여성에서 Wnt 길항물질계 유전자 다형성, 순환계내 osteoprotegerin, receptor activator of NF- κ B ligand 및 골밀도의 연관성

학위구분: 박사

학 과: Department of Obstetrics and Gynecology

학 번: 2009-31085

연 락 처: dolee@ncc.re.kr

저 작 자: 이 동 옥 (인)

제 출 일: 2012년 7월 6일

서울대학교총장 귀하

초 록

서론: 한국 폐경여성에서 Wnt 길항물질계 유전자내 다형성과 골밀도, 순환계 내 골교체인자 및 receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) 사이에 연관성이 있는가를 분석하여 Wnt 길항물질계 유전자내 다형성이 골다공증이 발생할 위험이 있는 폐경여성을 예측할 수 있는 새로운 지침자로서 사용될 가능성이 있는지 알아보고자 하였다.

방법: 자연폐경 후 한국여성 399명에서 Wnt 억제인자 (Wnt inhibitory factor: WIF), secreted frizzled-related-protein (SFRP)1, SFRP2, SFRP3, SFRP4, SFRP5, Dickkopf (DKK)1, DKK2, DKK3 유전자에서 총 19가지 단일뉴클레오티드다형성 (single nucleotide polymorphism: SNP)을 제한효소조각길이다형성, 염기서열분석과 Taqman 측정법 등을 이용하여 분석하고 Wnt 길항물질계 유전자내 단독 또는 복합 변이 양상에 따른 골밀도를 분석하고 역으로 골밀도 양상에 따른 이러한 유전자들의 분포를 분석하며 순환계에서의 OPG, 용질성 RANKL (soluble RANKL: sRANKL) 농도, 골교체인자와의 연관성을 비교분석하였다.

결과

- 1) WIF-1 유전자내 c.28G>A, c.496C>A, SFRP2 유전자내 c.-38C>G, c.134C>T, SFRP3 유전자내 c.598C>T, SFRP5 유전자내 c.34A>T, c.35C>A, DKK3 유전자내 c.92C>A, c.147G>A, c.706G>A에서 SNP는 관찰되지 않았다.
- 2) Wnt 길항물질계의 단일 유전자형 변이에 따라서는 요추 및 대퇴경부에서의 골밀도에는 차이가 없었다.
- 3) SFRP4 유전자내 c.958 C>A 다형성과 c.1019G>A 다형성양상에

의한 일배체형 (haplotype) 유전자형 AA/AA에서 요추에서의 골밀도가 다른 유전자형에 비하여 가장 낮았고 ($p<0.05$), 일배체형 유전자형 AA/AA가 요추에서의 골다공증 여성에서 정상 골밀도 여성보다 4.37배 더 빈번하게 관찰되었다.

4) SFRP4 유전자 c.958C>A 다형성의 CC 유전자형에서 혈청 carboxy-terminal telopeptide of type I collagen (CTX) 농도가 다른 유전자형에 비하여 낮았고 ($p<0.05$), SFRP5 유전자 c.20G>C 다형성의 GG 유전자형 ($p<0.05$)과 SFRP4 일배체형 유전자형 AA/AA($p<0.001$)에서 골 알칼리 인산분해효소 (bone alkaline phosphatase: BAP) 농도가 가장 높았다는 것을 제외하고 Wnt 길항물질계 다른 단일 유전자 다형성에 의한 유전자형과 SFRP1 일배체형 유전자형 및 SFRP4 일배체형 유전자형에 따른 혈청 오스테오칼신, 부갑상선호르몬, 칼시토닌, 칼슘 농도 차이가 없었다.

5) SFRP1 일배체형 인자 CC를 가지지 않은 동형접합 일배체형 유전자형에서 다른 일배체형 유전자형보다 혈청 sRANKL/OPG 비가 높다는 것을 제외하고 Wnt 길항물질계 단일 유전자 다형성에 의한 유전자형과 SFRP4 일배체형 유전자형에 따른 혈청 OPG, sRANKL, 혈청 sRANKL/OPG 비에 차이가 없었다.

결론: 이상의 결과는 한국여성에서 Wnt 길항물질계 중 SFRP4 유전자 c.958C>A와 c.1019G>A 다형성으로 구성된 일배체형 유전자형이 요추에서의 골밀도에 영향을 주는 유전자 중의 하나일 수 있다는 것을 시사한다.

주요어: 한국폐경여성, Wnt 길항물질, 유전자 다형성, 골밀도
학 번: 2009-31085

목 차

초록.....	i
목차.....	iii
그림 목록.....	iv
표 목록.....	v
서론.....	1
연구대상 및 방법.....	10
결과.....	23
고찰.....	47
참고문헌.....	53
초록 (영문).....	64

그림 목록

Figure 1. The c.598C>T (*TaqI*) SNP in the exon 4 (A) and c.970C>G (*Bst*uI) SNP in the exon 6 (B) of SFRP3 gene.-----21

Figure 2. Direct sequencing of c.958C>A SNP site (A) and c.1019G>A SNP site (B) in exon 6 of SFRP4 gene.-----25

Figure 3. Direct sequencing of c.29G>C SNP in the exon 1 of SFRP5 gene.-----26

Figure 4. Taqman assay of rs16890444C>T SNP and rs3242C>T SNP in SFRP1 gene.-----27

Figure 5. Taqman assay of c.318A>G SNP in the exon2 of DKK1 gene, c.437G>A SNP in the exon 3 of DKK2 gene and c.1003A>G SNP in the exon 6 of DKK3 gene.-----28

표 목 록

Table 1. PCR primers for SNPs in Wnt antagonists genes.-----	16
Table 2. Genotype and allele frequencies at polymorphic sites.-----	29
Table 3. Clinical characteristics and bone mineral density in postmenopausal women in relation to DKK1 c.318A>G, DKK2 c.437G>A and DKK3 c.1003A>G SNPs.-----	32
Table 4. Clinical characteristics and bone mineral density in postmenopausal women in relation to SFRP1 rs3242C>T and rs16890444C>T SNPs.-----	33
Table 5. Clinical characteristics and bone mineral density in postmenopausal women in relation to SFRP3 c.970C>G and SFRP5 c.20G>C SNPs.-----	34
Table 6. Odds ratio for osteoporosis at lumbar spine	

and femoral neck according to single genotype.-----35

Table 7. Serum bone turnover markers in postmenopausal women in relation to DKK1 c.318A>G, DKK2 c.437G>A and DKK3 c.1003A>G SNPs.-----36

Table 8. Serum bone turnover markers in postmenopausal women in relation to SFRP1 rs16890444C>T and rs3242C>T SNPs.-----37

Table 9. Serum bone turnover markers in postmenopausal women in relation to SFRP3 c.970 c>G and SFRP5 c.20 G>C SNPs.-----38

Table 10. Serum levels of OPG, and RANKL in postmenopausal women in relation to polymorphic sites.-----39

Table 11. The SFRP1 rs3242C>T and rs16890444C>T haplotype and genotype frequencies.-----42

Table 12. The SFRP4 c.958C>A and c.1019G>A

haplotype and genotype frequencies.-----43

Table 13. Demographic data and bone mineral density in postmenopausal women in relation to SFRP1 rs3242C>T and rs16890444C>T haplotype genotype.---44

Table 14. Odds ratio for osteoporosis at lumbar spine and femoral neck according to SFRP1 rs3242C>T and rs16890444C>T haplotype genotypes.-----45

Table 15. Serum levels of bone turnover markers, OPG, and sRANKL in postmenopausal women in relation to SFRP4 haplotype genotype.-----46

서론

골강도 (bone strength)의 저하로 인한 골절에의 취약성으로 정의되는 전신적 골질환인 골다공증은 특히 고령화 사회로 접어든 우리나라에서 중요한 질환 중 하나이다. (1) 골강도는 골의 미세구조, 무기질화 등의 골의 질도 영향을 주지만 골밀도가 골강도의 약 70%를 결정하며 골량은 유전적 인자로 인해 70% 정도가 결정되게 된다. (2) 따라서 골량을 결정하는 유전인자를 밝히기 위하여 많은 연구가 진행되었다. (3,4) 골다공증은 다양한 유전자가 복합적으로 작용하는 질환으로서 각 인종별로 주된 영향을 주는 유전인자가 달라지므로 인종별 연구가 각각 필요하다. 지금까지 김 등은 골다공증의 주요 유전인자인 에스트로겐 (estrogen) 수용체의 *PvuII* and *XbaI* 다형성 (5)이나 인슐린양성장인자 (insuline like growth factor) (CA) 다형성 (6), 비타민D 수용체 *baTL* 일배체형 (haplotype) (7), osteoprotegerin (OPG) 유전자 1181G>C 다형성 (8), 기타 종양괴사인자 (tumor necrosis factor) 수용체 다형성 (9) 등이 한국인에서 골다공증에 영향을 주는 인자임을 밝힌바 있다.

최근 골의 재형성에 있어서 Wnt 신호체계 역할의 중요성이 대두되고 있다. (10,11) Wnt는 세포 외로 분비되는 당단백질 (glycoprotein)로서 신호전달경로에 따라 canonical Wnt (Wnt1, Wnt3A, Wnt8)와 non-canonical Wnt (Wnt5, Wnt5A, Wnt10)의 두 개의 군으로 나누어진다. Canonical Wnt 신호전달경로는 베타-카데닌 (β -catenin)의 안정화에 의해 전사인자인 T-cell factor (TCF)/lymphoid enhancer factor (LEF) 활성화를 유도하여 개체 발생과 형태학적 변형 및 세포의 증식, 분화, 세포자멸사에 중요한 역할을 담당하는데 Wnt는 막수용체 (transmembrane receptor)인

frizzled (FZD)계와 단일막단백질 (single transmembrane protein)인 저밀도지단백수용체관련단백 (low density lipoprotein receptor-related protein: LRP)-5/6에 결합하여 작용한다. (11)

Canonical Wnt 신호전달은 조골세포 전구세포의 성장을 자극하고 조골세포 분화의 초기과정을 자극하며 분화되지 않은 전구세포 (progenitor) 중간엽 줄기세포 (mesenchymal stem cell: MSC)의 증식에 관여하고 non-canonical Wnt 신호전달은 골원성 분화를 촉진한다. (12) 조골세포, 연골세포로 분화되는 적당한 유도 신호를 받지 않은 경우 MSC에서 지방발생 (adipogenesis)이 일어난다고 생각되고 있는데 Wnt1과 Wnt10b는 전지방세포 (preadipocyte)의 지방발생을 막고 (13) Wnt3a의 과발현이 C3H10T1/2 세포에서 PPAR γ 2 및 지방세포의 지방산결합단백 (fatty acid binding protein) 생산을 억제한다고 한다. (14)

Canonical Wnt 신호전달이 Runx-2 유전자 발현을 직접 자극하여 골형성을 증가시키고, (15) TGF β 가 Wnt 7a발현과 canonical Wnt 신호전달을 통하여 MSC의 분화과정에 관여하며 (16) 부갑상선호르몬 (parathyroid hormone: PTH)의 골에 대한 작용 또한 LRP5/6, FZD-1 발현 등 Wnt 신호전달계 변화를 통하여 작용한다고 보고되고 있다. (17) 또한 Wnt 신호전달이 bone morphogenic protein (BMP) 발현을 조절하여 배아줄기세포의 분화를 조절하다고 보고된다. (18) Wnt canonical 신호전달의 주요 역할은 조골세포의 분화와 기능인데 파골세포의 조절과는 직접적인 관련은 없으나 Wnt는 receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)와의 상호작용을 통해 OPG 발현을 조절하는 것으로 보이는 등 (19) Wnt 계와 RANKL 계 사이에 혼신 (cross-talk) 가능성이 보고된다. (14)

Wnt의 길항물질은 세포 외, 세포질 내, 핵 내에 여러 가지로 존재하는데 세포 외 길항물질로는 secreted frizzled-related-proteins (sFRPs)가 Wnt 단백질과 결합하여 FZD 수용체와 Wnt의 결합을 방해한다. Dickkopf (Dkk)와 sclerostin (SOST)은 LRP5/6 수용체에 결합하여 비활성화시키는 역할을 한다. 세포질 내에서는 glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β)가 β -카테닌을 인산화하여 분해하여 Wnt계를 길항하며 핵 내에서는 Ctnnbip1/Icat이나 Cby/Chibby 등이 β -카테닌과 TCF 결합체를 억제한다. (10)

이 중 Dkk에는 4가지 종류가 있는데 235-255개의 아미노산으로 구성된 당단백 분비물로서 N-, C-말단 (terminal)에 각각 Cys-1과 Cys-2라 불리는 시스테인이 많은 도메인 (cystein-rich domain: CRD)을 가지고 있다. (10) Dkk1, Dkk2, Dkk4는 구조적, 기능적으로 LRP5, LRP6와 상호작용하며 Wnt 신호전달계에 영향을 미친다. (10) Dkk1과 Dkk4는 LRP5/6과 Kremens (Krm) 1/2에 결합하여 Dkk-LRP-Krm trimolecular complex를 형성하여 세포 표면으로부터 세포내이입 (endocytosis)에 의하여 제거되어 Wnt 신호를 억제한다. (11) 특히 Dkk1은 조골세포의 성장과 분화의 중요한 조절인자로 여겨지는데, DKK1 발현이 저하된 생쥐에서는 골량이 높고 발현이 증가된 생쥐에서는 골량이 감소되고 골절이 일어나기 쉽게 되며 DKK1 역배열의 올리고뉴클레오티드 (antisense oligonucleotide)를 처치할 경우 쥐에서 조골세포가 증가되고 파골세포가 감소된다는 보고가 있다. (19) 또한 Dkk1은 조골세포의 형성을 억제하고 MSC에서 지방발생을 유도하며 β -카테닌 경로를 억제하여 연골형성이나 골형성을 억제함으로써 결과적으로 연골 내 골형성을 막는다. (20) Dkk1은 사지 형성 과정에서 BMP4와 BMP5에 의해 활성화되어 세

포자멸사를 유도하는 것으로 보여 동물 실험에서 탈리도마이드 (thalidomide) 투여 시 나타나는 사지기형이 Dkk1 차단에 의해 부분적으로 차단되는 것으로 알려졌다. (21) Endothelin-1의 조골세포 증식과 신생골 형성과정은 Dkk1의 억제에 의해 일어나고 (22) Dkk1은 골절의 치유 과정에도 관여하며 (20) 조골세포에서 Dkk1의 활성화는 글루코코르티코이드 (glucocorticoid) 유발성 골다공증이나 에스트로겐 결핍으로 인한 골다공증에서 관찰된다. (23) 또한 염증성 관절염에서 골과 관절의 주요 병리 결정인자로 보이는 등 Dkk1은 골다공증과 같이 골량과 관련된 질환의 중요한 표적인자가 되고 있다. (24) Dkk2는 LRP6와 Krm2에 결합하여 Wnt1에 의하여 유도된 유전자의 전사를 차단하므로 억제될 경우 골량의 증가가 예상되나 Krm 표현양에 따라서 β -카테닌을 활성화하기도 하여 Dkk2 적중쥐 (knockout mice)에서는 오히려 조골세포 분화의 감소와 파골세포 기능의 증가로 인한 골감소 현상이 관찰되기도 한다. (25) 따라서 Dkk2의 소실은 조골세포의 최종 분화와 기질화에 결함을 유발하는 것으로 보인다. 골관절염 환자에서 비정상적인 조골세포의 발현은 Dkk2 발현 정도와 연관성을 보인바 있다. (26) Dkk3는 LRP6 또는 Krm1/2와 결합하지 않아 Wnt 신호에 알려진 효과는 없다. 연골내 (endochondral) 골형성에 Dkk3가 억제 역할을 한다고 하나, (27) Dkk3 적중쥐는 골 형질에 변화를 보이지 않는다. (10)

Wnt inhibitory factor (WIF)-1은 Wnt 리간드에 결합하여 Wnt 신호를 억제하는데 명확한 기전은 알려져 있지 않지만 여러 가지 암종에서 발암과정에 관여하는 것으로 보고되었고 (27) 조골세포의 분화를 억제하는 것으로 알려져 있다. (28) FZD나 sFRP의 CRD와 유사성을 보이지 않으나 Wnt-8에 결합할 수 있다. (29)

sFRP는 N-말단 부위가 FZD 수용체의 Wnt 결합부위와 동일하여 붙여진 명칭으로 sFRP에는 5가지 종류가 있는데 서열 동종성 (sequence homology)에 따라 sFRP1, sFRP2, sFRP5가 한 그룹을 이루고 sFRP3과 sFRP4가 다른 그룹으로 분류된다. (29) sFRP는 독립적인 두 개의 도메인을 가지는데, N-말단엔 CRD가 있어 FZD의 CRD와 동일하다. C-말단은 sFRP1, sFRP2, sFRP5가 비슷한 시스테인 (cysteine) 배열 (spacing)을 공유하고 sFRP3, sFRP4가 또 다른 시스테인 배열을 공유하며 다른 종류의 이황화결합 (disulphide bond)을 형성한다. 유전암호해독 후 변화 (post-translational modification) 과정에서는 sFRP1, sFRP5는 티로신 황산화 (tyrosine sulphation)을 통해 안정화되지만 sFRP2, sFRP3, sFRP4에서는 이러한 과정이 일어나지 않아 안정성의 차이를 보인다. (30) sFRP가 Wnt 신호체계를 조절하는 기전은 CRD나 neutrin-related (NTR) 도메인을 통해 Wnt를 분리 (sequestration) 시키는 방법으로 작용할 수도 있고 서로의 활성을 희석 (titrating out) 시켜 결과적으로 Wnt 전달체계를 활성화 시킬 수도 있으며, (30) FZD 수용체와 비활성화 결합물을 형성하여 신호전달을 억제하거나 (31) Wnt-FZD 상호작용을 양측 물질에 결합하면서 신호 활성화를 시킬 수 있다. (32) 또한 sFRP는 섬유결합소 (fibronectin), Unc5H3, RANKL, BMP/Tolloid와 같은 Wnt 신호체계와 관련 없는 분자와도 상호작용 하는 것으로 알려져 있는데, (30) 특히 sFRP1은 RANKL에 결합하여 작용을 억제하는 것으로 알려져 있다. (33)

sFRP1은 낮은 농도에서는 Wnt 작용제로 작용하기도 하며 높은 농도에서는 길항제로 작용한다. (34) 생쥐에서 골형성의 속도를 늦추고 척수동물에서 골형성을 억제하며 인간에서 조골세포의 분화 기간 동안 전조골세포 (pre-osteoblast)에서 전골세포

(pre-osteocyte)까지 Sfrp1의 mRNA의 양은 20배 증가했다가 성숙된 골세포가 되면 감소하는 현상을 보인다. (35) 이러한 표현 양상은 세포자멸사 속도와도 연관을 가져서 sFRP1은 조골세포와 골세포의 생존에 중요한 역할을 하는 것으로 보여 sFRP1이 증가하면 세포자멸사가 증가하고 sFRP1이 감소하면 조골세포의 사멸이 감소한다. (35) sFRP1은 연골과 조골세포, 파골세포에서 발현되며 파골세포의 형성을 억제하는 기능을 보이기도 한다. (33) Sfrp1 결핍 쥐에서는 해면골 밀도, 부피, 광물화 (mineral apposition)가 증가하지만 피질골 밀도에는 변화를 보이지 않고, 노화와 관련된 골소실과 지방 축적을 감소시킨다. (36) 재조합 sFRP1을 주입하는 경우 대퇴근위부 골밀도와 해면골 부피가 감소하고 (37) Sfrp1 유전자를 과발현 시킨 쥐에서는 근위부 대퇴와 요추 해면골밀도가 감소하는 현상도 보인다. (38) Sfrp1 기능을 결손 시킨 쥐에서는 조기 골유합이 증가하면서 골절치유 과정이 빠르게 진행되는 소견을 보이는데 이는 조골세포의 분화가 Wnt 신호체계에 의해 활성화되기 때문인 것으로 보인다. (39) 스테로이드 사용시 조골세포의 기능 저하가 sFRP1의 증가와 관련 있으며 이러한 현상이 알렌드로네이트 (alendronate)나 PTH 사용 시 감소하며 (40) Sfrp1 적중쥐에서는 PTH 처치 후에도 해면골 형성의 증가가 나타나지 않는 것이 관찰되는 만큼 sFRP1은 임상적으로도 이용 가능성이 있다. (41) sFRP1은 골수의 기질세포가 조골세포나 연골세포로 분화하거나 지방세포로 분화하는 데에도 영향을 끼치며 지방세포로 분화되는 기질세포에서는 Wnt 신호전달계가 억제 되어 있으면서 sFRP1의 mRNA나 단백질이 증가되어 있는 양상을 보이고 재조합 sFRP-1을 처치할 경우 용량에 따라 조골세포의 분화를 억제하고 지방세포의 분화를 촉진시키는 현상을 보이는 만큼 골수 내 기질세포의 혼신 (cross-talk)에 주요 역할을 하는 것으로 보인다. (42)

sFRP2는 일차 인간 조골세포 (primary human osteoblast)에서 검출되고 canonical Wnt 신호를 억제하며 Wnt-4의 활성화를 조절하면서 sFRP1을 억제하기도 하는데, (43) 이는 Wnt 계에 대한 친화도의 차이에서 기인하는 것으로 보인다. Wnt3a 신호전달을 확장시켜 LRP6의 인산화 (phosphorylation)를 유도하고 세포질 내 β -카테닌의 농도를 높이고 핵으로의 전위 (translocation)를 유도한다는 보고도 있다. (44) sFRP2는 사기질모세포종 (ameloblastoma)에서 발현이 증가하며 골형성의 저하를 가져오는 것으로 알려져 있다. (45)

SFRP1과 SFRP2 유전자의 이상은 여러 암종과 관련성을 보이는데 돌연변이로 인한 변화나 CpG 섬 (island)의 과메틸화 (hypermethylation)를 통한 유전자의 침묵 (silencing)이 유방암, 위암, 자궁경부암, 간세포암, 췌장암, 신장암, 전립선암, 대장암 등의 위험을 높이는 것으로 알려져 있다. (46)

sFRP3는 FrzB라고도 알려져 있는데 골의 연골조직 부위에서 표현되며 non-canonical Wnt 경로를 차단한다. (29) sFRP3는 조골세포의 증식을 감소시키거나 분화는 증가시키는 작용을 하며 Wnt 수용체와 다른 경로로도 작용하는 것으로 보인다. (47)

sFRP4는 신장세포에서 canonical Wnt 신호를 억제하여 신장에서의 무기성 인산염 (inorganic phosphate) 재흡수를 억제하여 인산 이온 항상성 (phosphate ion homeostasis)과 비타민 D 대사를 조절하여 골강도에 간접적으로 영향을 미친다. (29) 중앙 유발 골연화증 (tumor-induced osteomalacia) 환자에서 sFRP4가 인산염요증

(phosphaturia)을 유발하면서 골연화증의 원인이 되는 것으로 알려져 있다. (48) 하지만 쥐에서 Sfrp4를 과발현 시킬 경우 나이가 들어감에 따라 골밀도 증가량은 정상 쥐에 비해 유의하게 감소하지만 골연화증은 일어나지 않고 혈중 인 농도와 요중 인 농도는 유의하지 않은 변화만을 보이기도 한다. (49) 또한 골관절염 연골의 연골세포에서도 발현되며 세포자멸사에 관여하는 것으로 보인다. (50) sFRP4는 FrzB-2라고도 알려져 있고 sFRP5는 SARP3라고도 알려져 있는데 이들은 Wnt에 결합하긴 하나 Wnt 신호전달계에 어떠한 작용을 하는지 알려져 있지 않다. (29) 노화-가속화 쥐모델 (senescence-accelerated mouse: SAM)P6에서 sFRP4는 40배 까지 발현이 증가하고 골형성을 억제하고 골밀도를 감소시키는 작용을 한다. (51) 인간 지방조직유래 중간엽 줄기세포 (human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell)의 지방세포로의 분화과정에서는 sFRP4가 점차적으로 증가하면서 FZD1, FZD7과 β -카테닌 발현이 감소하는 현상을 보이는 것으로 보아 지방세포 분화에도 기여하며 (52) 중간엽 줄기세포에 처치 시 낮은 농도에서 Wnt-3a-유도 알칼리인산 분해효소 (induced alkaline phosphatase)를 활성화 시킨다. (53)

sFRP5는 Wnt5a와 Wnt11에 결합하여 canonical과 non-canonical Wnt 신호전달계에 모두 억제 작용을 하는데 (54) 지방세포에서도 만들어지며 비만에서 대사 이상을 조절하는 항염증 아디포카인 (adipokine)으로도 작용한다. (55) 쥐의 발생과정에서 앞 내장내배엽 (anterior visceral endoderm)에서 발현되나 sFRP5 결핍 쥐에서 골격에 이상이 없는 것으로 보아 발생과정에 중추적 역할을 하진 않는 것으로 보인다. (56)

이들 Wnt 길항물질들의 유전자 다형성과 골밀도와의 연관성은 DKK1, SFRP1, SFRP3, SFRP4에서 몇몇 연구를 통해 분석된 바 있다. (57-63) Gao 등 (57)은 FZDB 유전자의 다형성이 (rs6433993, rs409238, rs288324, rs466865) 중국인에서 최대 골량과 관련 없다고 보고하였고, 백인 여성에서는 FZDB 유전자 Arg200Trp 다형성이 골다공증과 관련 있음이 보고된 바 있다. (59) 8p11.21에 위치하는 SFRP1 유전자의 다형성이 일본인 (60)과 호주인 (61)에서 골밀도와 연관성을 보였는데, 일본 폐경 여성에서 SFRP1 유전자의 rs16890444, rs3242 다형성이 요추와 대퇴경부 골밀도와 연관성을 보이고 호주인에서 SFRP1 유전자 다형성은 골밀도와 관련성을 보였으나 SFRP2, DKK1, DKK2 유전자 다형성은 관련 없었다. (62) 20대 젊은 백인 남성을 대상으로 한 연구에서 DKK1 유전자 다형성은 골밀도와 연관성을 보이지 않았다. (61) 한국 폐경 여성을 대상으로 한 연구에서 SFRP4 유전자 c.1019G>A 다형성이 골밀도와 연관성을 보인바 있는데 함께 분석한 Wnt9a, LRP5, axin II, glycogen synthase kinase binding protein, β -카테닌, TCF 유전자 다형성은 골밀도와 관련 없었다. (58) 이에 본 연구에서는 지금까지 연구된 바 없는 DKK2, DKK3, SFRP2, SFRP5, WIF-1을 포함한 Wnt 계 길항물질의 유전자 다형성과 골밀도와의 연관성을 알아보고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구대상

서울대학교병원 폐경클리닉을 방문한 48-75세사이의 자연폐경여성 399명을 대상으로 하였다. 이들은 적어도 1년 이상 자연적인 생리가 없는 여성들이었다. 병력 청취와 자세한 이학적 검사를 시행하고 혈청 당, 간기능과 신장기능 검사를 시행하여 양측 난소절제술을 받은 여성과 현재 간질환이나 신장질환, 당뇨병 등이 있는 여성은 제외되었다. 또한 골대사에 영향을 줄 수 있는 칼슘, 비타민 D, 칼시토닌 (calcitonin) 또는 에스트로젠을 사용하는 여성은 제외되었다.

2. 혈액채취 및 체질량지표 측정

모든 연구대상자들로부터 혈액을 ACD 용액 (citric acid 0.48g, sodium citrate 1.32g, glucose 1.47g, 3차 증류수 100ml)이 들어 있는 튜브에 채취하고 연막 (buffy coat)을 제조 후 냉장 보관하였다가 DNA추출에 사용하였다. 일부 혈액은 항응고제가 들어 있지 않은 튜브에 채취하여 각각 원심분리하여 혈청을 모아서 -70°C 에 보관하였다가 OPG, sRANKL 와 골교체의 생화학적 인자 등 측정에 사용하였다. 키와 체중을 측정하여 체질량지표 (body mass index: kg/m^2)를 계산하였다.

3. 골밀도 측정

연구대상자에서 척추, 대퇴골경부, 대퇴돌기의 골밀도 측정

에 Lunar사(Lunar DPX-L, Fort Myers, Florida, USA)의 DXA를 이용하였다. 이 측정기의 요추 골밀도 측정에서의 체내 변이계수(*in vivo* coefficient of variation)는 1.4%, 대퇴골경부 2.1%, 대퇴돌기 1.1%이었다. 골감소증과 골다공증은 WHO 정의에 따라 한국인 젊은 여성의 평균치의 1 - 2.5표준편차의 감소가 있는 경우 골감소증으로 진단하고, 골다공증은 한국인 젊은 여성의 평균치보다 2.5 표준편차 이상의 감소가 있는 경우에 진단하였다.

4. 혈청 칼시토닌, PTH, 칼슘측정

혈청 칼시토닌은 Cis bio international 사 (Ceze, France)에서 구입한 면역방사선 측정키트를 사용하여 측정하였다. 측정 민감도는 1.5 pg/ml이었고 측정간의 변이는 3.4%, 측정 내 변이는 3.1%이었다. PTH는 Nichols Institute Diagnostics사 (San Clemente, California, USA)의 완전한 PTH 측정 키트를 사용하여 측정하였으며 민감도는 1 pg/ml 이었고 측정간의 변이는 5.6%, 측정 내 변이는 3.4%이었다. 칼슘은 원자흡광광도계를 사용하여 측정하였다.

5. 혈청 골교체인자 측정

혈청 오스테오칼신 (osteocalcin: OST)은 ELSA-OSTEO 키트(CIS bio international, Ceze, France)를 이용하여 면역방사선 측정법으로 측정하였다. 측정 민감도는 0.4 ng/ml이었고 측정간의 변이는 5.2%, 측정 내 변이는 3.8%이었다.

혈청 골 알칼리 인산분해효소 (bone alkaline phosphatase: BAP)는 Metra Biosystems사 (Mountain View, California, USA)의 Alkphase-B 키트를 사용하여 면역측정법으로 측정하였다. 측정 민

감도는 0.7 U/L이었고 측정간의 변이는 5.2%, 측정 내 변이는 3.9%이었다.

혈청 carboxy-terminal telopeptide of type I collagen (CTX)은 Osteometer사 (Herlev, Denmark)의 혈청 CTX 키트를 사용하여 측정하였다. 측정 민감도는 94 pM 이었고 측정간의 변이는 5.4%, 측정 내 변이는 5.0%이었다.

6. 혈청 OPG와 sRANKL 측정

1) OPG 측정

OPG 측정은 R&D사 (Minneapolis, Minnesota, USA)의 정량적 효소면역키트를 사용하여 측정하였다. 즉, 생쥐 항인간 OPG 항체 96 구멍 미세판에 넣어 실온에서 18시간 방치한 후 3회 세척하고 1% 우혈청 알부민(bovine serum albumin)을 함유한 인산염 완충 식염수 (phosphate buffered saline) 용액을 넣어 실온에서 1시간 방치한 후 다시 3회 세척하였다. 구멍에 검체를 넣고 실온에서 2시간 반응시킨 다음 세척하고 비오틴화된 (biotinylated) 염소 항인간 OPG 항체를 넣어 실온에서 2시간 반응시키고 그 후 3회 세척하였다. 스트렙토아비딘-서양고추냉이 과산화효소 (streptoavidin-horseradish peroxidase) 결합체 용액을 넣어 실온에서 천천히 흔들면서 20분간 반응시켰다. 그 후 3회 세척하고 테트라메틸벤지딘 (tetramethylbenzidine) 기질용액을 넣어 실온에서 20분간 반응시킨 후 정지 용액을 넣은 다음 450 nm에서의 흡광도를 측정하고 표준곡선에서 농도를 구하였다.

2) sRANKL 측정

sRANKL은 Biomedica Gruppe 사 (Wien, Austria)의 인간 가용성 (human soluble) RANKL 효소면역 키트를 사용하여 측정하였다. 즉, OPG를 함유한 구멍에 검체를 넣고 여기에 비오틴화된 다클론 (polyclonal) 용해성 RANKL 항체를 넣어 4°C에서 18시간 반응시키고 그 후 5회 세척하였다. 그 후 스트렙토아비딘-서양고추냉이 과산화효소 결합체 용액을 넣어 실온에서 천천히 흔들면서 1시간동안 반응시켰다. 그 후 5회 세척하고 테트라메틸벤지딘 기질용액을 넣어 실온에서 30분간 반응시킨 후 정지 용액을 넣은 다음 450 nm에서의 흡광도를 측정하고 표준직선에서 농도를 구하였다. 측정 민감도는 1.6 pg/ml이었고 측정간의 변이는 7.2%, 측정 내 변이는 3.9%이었다.

7. 혈액에서 DNA 추출

냉장 보관하였던 연막에 적혈구 용해 완충용액 (lysis buffer; 1M Tris pH 7.6 10 ml, 1 M MgCl₂ 5 ml, 1M NaCl 10 ml, 3차 증류수 975 ml로 제조)을 혼합하여 1,500 rpm으로 5분 원심분리한 다음 상청액을 제거하였다. 다시 적혈구 용해 완충용액을 넣고 원심분리한 후 200 µl만 남겨놓고 상청액을 제거한 후 QIAamp blood 키트 (QIAGEN Inc., Valencia, California, USA)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 즉 25 µl 단백질분해효소 (proteinase) 용액, 200 µl 완충용액을 추가하고 15초 동안 혼합한 후 70°C 수온저에서 10분간 반응시켰다. 여기에 210 µl의 에탄올을 넣어 다시 섞어준 다음 수집 튜브에 들어 있는 QIAamp 원주(column)에 상기 혼합물을 옮기고 8,000 rpm으로 1분간 원심분리 하였다. 완충용액 AW 500 µl를 넣고 8,000 rpm 1분, 3분 2회 원심분리 하였다. 미세튜브에 원주를 옮기고 미리 70°C까지 가열된 완충용액 AE 200 µl를 넣고 실온에서

2분간 방치한 다음 8,000 rpm으로 2분간 원심분리 하여 DNA를 추출하였다. 260 nm에서의 흡광도를 측정하여 정량하였다.

8. Wnt 길항물질계들 유전자 다형성 측정

본 연구에서 측정한 Wnt 길항물질계 유전자 다형성은 코드화 부위 (coding region)에 있는 non-synonymous SNP로서 소대립유전자 (minor allele) 빈도가 5% 이상이거나 Hapmap 자료가 없는 경우에 선택하였는데 선택된 SNP부위는 WIF-1 유전자내 c.28G>A, c.496C>A, SFRP1 유전자내 rs3242C>T, rs16890444C>T 다형성, SFRP2 유전자내 c.-38C>G, c.134C>G, SFRP3 유전자내 c.598C>T, c.970C>G 다형성, SFRP4 유전자내 c.958C>A, c.1019G>A, SFRP5 유전자내 c.20 G>C, c.34A>T, c.35C>A, DKK1 유전자의 c.318A>G, DKK2 유전자의 c.437G>A, DKK3 유전자내 c.92C>A, c.147G>A, c.706G>A, c.1003A>G 다형성이었다.

1) WIF-1 유전자내 c.28G>A, c.496C>A, SFRP2 유전자내 c.-38C>G, c.134C>T, SFRP4 유전자내 c.958C>A, c.1019G>A, SFRP5 유전자내 c.20G>C, c.34A>T, c.35C>A, DKK3 유전자내 c.92C>A, c.147G>T, c.706 G>A SNP 측정

DNA 주형 100 ng을 가진 0.5 ml 튜브에 PCR 완충용액 (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 각 0.2 mM의 dNTP, 10 pM의 시발체들 (Table 1), Taq DNA 중합효소 (polymerase) 0.5 단위를 추가한 반응 혼합용액 25 μ l를 만들어 중합효소반응 (polymerase chain reaction: PCR)으로 증폭하였다. PCR

산물을 확인하기 위하여 4 μ l를 취하여 6 x 염색액 2 μ l와 혼합하여 2% 한천 겔에서 전기영동 후 브롬화 에티뒴 (ethidium bromide)으로 염색하고 자외선 투시기로 증폭된 DNA 띠를 확인하였다.

Table 1. PCR primers for SNPs in Wnt antagonists genes.

Gene	Location	db SNP ID	Base (amino acid) alteration	PCR primer	Annealing temp (°C)	Fragment size (bp)
WIF	exon1	rs11539163	c.28G>A(A10T)	F1:TGCAGCGCAGCAGAGATC R1:GGGGAACACTCTTTTGTGGA	60	355
	exon4	rs17851594	c.496C>A(Q166K)	F1:CTCCTCCTTCCGTTGCTGTA R1:TTCAAGTTGGTTTCCCATGTC F1:CAGAACGCTGGCTGATTGG R1:GGGCACTCAGGTAACATCATCTG	60	299
SFRP1		rs16890444	C>T	VIC primer:CTTCCCACGGCAGCAG FAM reporter: CTTCCCACAGCAGCAG F:CCAGATGTTTTGATGTTATCG -CTTATGTT R:AAGTGAATATTGATACATGGC -TGAAAAAGC		
	3-UTR	rs3242	C>T	VIC primer:ATGAACACGTACGG -GAAT FAM reporter:AATGAACACATACG -GGAAT		
SFRP2	5-UTR	rs13137510	c.-38C>G	F1:CCAGCAACGGCTCATTCT R1:CAGCACCTCCTTCATGGTCT	60	471
		rs4643790	c.134C>T(A45V)	F1:TGTTCCATTTCGTTGAATATC		
SFRP3	exon4	rs288326	c.598C>T(R200W)	R1:ACATCATGGCACTTAGTCTT -TATCTCTTTAACTTTAGCTC F:TGGTGATATGTGCTTGTGAC	54	193
	exon6	rs7775	c.970C>G(R324G)	R:AGTCCACTGTGTTACTTTTTGT -ATTTCCGGGATTTAGTCGC F:CADGAACAGCGGAGAACAGT R:TGGCCTTACATAGGCTGTCC	60	297
SFRP4	exon6	rs1802073	c.958C>A(P320T)		60	251
		rs1802074	c.1019G>A(R340K)		60	425
SFRP5	exon1	rs11815012	c.20G>C(G7A)	F1:GCGGCTGGGTAGAGTCAG R1:AAGACCTGCGTATCCGAGTG		
		rs12775414	c.34A>T(T12S)			
		rs12774287	c.35C>A(T12K)	F1:CACTGATGAGTACTGCGTAGT R1:CTGCAGGCGAGACAGATTTG		
DKK1	exon2	rs2241529	c.318A>G(A106A)	VIC primer: CACGCTGCGTCC FAM reporter: CACGCCCCGCTCC		

				F:TGAAAGCATCTTAACCCCTCA		
				-CATC		
				R:GTTTGAGTAATGACCGTGGTTT		
				-CG		
DKK2	exon2	rs17037102	c.437G>A(R146Q)	VIC primer:ATCTCTGTGCTGAG		
				-TACC		
				FAM reporter: TCTGTGCCGAGTA		
				-CC		
DKK3	exon1	rs11544814	c.92C>A(P31Q)	F:CTTCCATGCCTTCCCAGACT	60	451
		rs11544816	c.147G>T(E49D)	R:CTCGGTTTCCTCCCGTCT		
	exon6	rs2291598	c.706G>A(V236M)	F1:GCTCTAGCTCCCAGGTGATG	60	298
				R1:CTGCTTCAGCCCTACCAATC		
				F1:GAGGAGCCTGACTGAAGAGA		
				-TG		
		rs3206824	c.1003A>G(R335G)	R1:CCCTCCCAGCAGTGCAG		
				VIC primer:CAGGCTCCCTCAGCGC		
				FAM reporter:AGGCTCCCCCAGCGC		

(1) 한천 겔로부터 DNA 분리

PCR 산물을 2% 한천 겔에서 전기영동시켜 분리한 후 DNA 띠를 잘라내어 QIAEX II 겔추출 키트 (QIAGEN Inc., Valencia, California, USA)로 분리하였다. 즉, DNA띠를 함유한 겔조각을 가진 튜브에 1:3 용적의 QX I 완충용액과 QIAEX II 를 넣은 후 50°C에서 10분간 반응시키고 30초 동안 13,000 rpm으로 원심분리 하였다. 상청액을 제거한 후 남은 침전물에 QX I 완충용액, PE 완충용액으로 연속 세척하였고 침전물을 공기 중에서 30분간 건조시켰다. 증류수를 추가한 다음 혼합 부유시켜 실온에서 5분간 반응시키고 30초간 원심분리하여 상청액을 채취하여 사용 시까지 -70°C에 보관하였다.

(2) DNA 염기서열분석

염기서열을 결정하기 위하여 한천 겔에서 분리정제된 PCR 산물 100 ng을 사용하였다. 주기 염기서열분석 (cycle sequencing) 을 하기 위하여 PRISM™ Ready Dye Terminator Cycle Sequencing 키트 (Perkin-Elmer, ABI, Foster city, California, USA)를 이용하였다. 서열분석은 GeneAmp PCR system 9600 (Perkin-Elmer, ABI, Foster city, California, USA)을 이용하여 미리 96°C로 예열하였다가 10초 동안 온도를 유지한 후 96°C에서 30초, 50°C에서 15초, 그리고 60°C에서 4분씩 총 25회를 반응시켰다. 반응이 끝난 후 미반응된 뉴클레오티드 (nucleotide)는 Centri-Sep™ spin 원주 (Princeton, New Jersey, USA)를 사용하여 제거하였으며 SpeedVac (Savant, New York, USA)에서 30분간 건조시켰다. 그리고 4 µl의 deionized formamide: 50 mM EDTA(5:1)에 녹인 후 ABI

373A DNA 시퀀서 (sequencer)를 이용하여 변성된 4.75% polyacrylamide 겔에서 30W, 14시간 전기영동 시킨 후 ABI sequence software 1.2.1. (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA)로 결과를 분석하였다.

2) SFRP1 유전자 rs3242C>T, rs168904444C>T, DKK1 유전자의 c.318A>G, DKK2 유전자의 c.437G>A, DKK3 유전자의 c.1003A>G 다형성 측정

이러한 다형성은 Taqman 대립유전자 식별분석 (allelic discrimination assay)을 사용하여 측정하였는데 다형성부위가 포함된 부위를 Table 1에서와 같은 특이적 시발체를 사용하여 PCR로 증폭하였다. 한 개의 대립인자 지침자에 형광 아미드화 기질 (FAM: fluorescent amidite matrix)로 붙였고 다른 하나는 형광인 VIC 염색체를 붙였다. PCR은 각 구멍에 DNA 주형 20 ng을 가진 96 구멍판에 우라실 (uracil) N-glycosylase가 없는 Taqman 보편적 우세기질 (universal master mix), 시발체농도 900 nM, Taqman 지침자농도 200 nM를 추가한 반응 혼합용액 5 μ l를 만들어 시행하였다. 96 구멍판을 PE 9700 thermal cycler (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA)에 놓고 50°C에서 2분간, 95°C에서 10분간 가열 후 95°C에서 15초간 다시 변성, 60°C에서 1분간 가열과정으로 40주기를 시행하였다. Taqman 측정판을 Prism 7900HT instrument (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA)로 옮겨 각 구멍에서 형광강도를 읽은 후 SDS 2.1 software (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA)로 결과를 분석하였다. 그 후 각 SNP당 10개의 검체를 택하여 염기서열분석법으로 재확인하였다

3) SFRP3 유전자내 c.598C>T, c.970C>G 다형성측정

SFRP3 유전자 내 c.598C>T, c.970C>G 다형성을 측정하기 위하여 Table 1에 표시한 바와 같은 전방 시발체(forward primer)와 역시발체를 사용하여 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 1.5 mM MgCl₂, 250 μM의 dNTP와 1 unit Taq DNA 중합효소가 포함되어 있는 완충용액에서 100 ng의 지놈 (genome) DNA를 PCR로 증폭하였는데 PCR은 94°C에서 30초간 변성, 54°C에서 40초간 서냉복원 (annealing), 72°C에서 30초간 신장 (extension) 과정으로 30 주기 반복하였다. PCR로 얻은 산물은 *TaqI*에 각각 37°C에서 3시간 씩 반응시켜 브롬화 에티듬이 포함되어있는 2% 한천 겔에 전기영동 시킨 후 폴라로이드 사진촬영을 하였다 (Fig. 1A).

SFRP3 유전자내 c.970C>G 다형성의 경우에도 Table 1에 기술한 시발체를 사용하여 DNA를 증폭하였는데 PCR은 94°C에서 60초간 변성, 54°C에서 60초간 서냉복원, 72°C에서 90초간 신장시키는 35주기를 시행하였다. PCR로 얻은 산물은 *BstUI*에 37°C에서 3시간 씩 반응시켜 브롬화 에티듬이 포함되어있는 2% 한천 겔에 전기영동 시킨 후 폴라로이드 사진촬영을 하였다. *BstUI* 제한효소에 절단된 부위가 없는 것을 G 대립인자, 절단된 부위가 있는 것을 C 대립인자로 하였다. 증폭된 DNA 염기크기는 193 bp 이었는데 *BstUI* 제한효소로 처리한 후에 브롬화 에티듬이 포함되어있는 2% 한천 겔에 전기영동 시킨 후 폴라로이드 사진촬영을 하였다 (Fig. 1B).

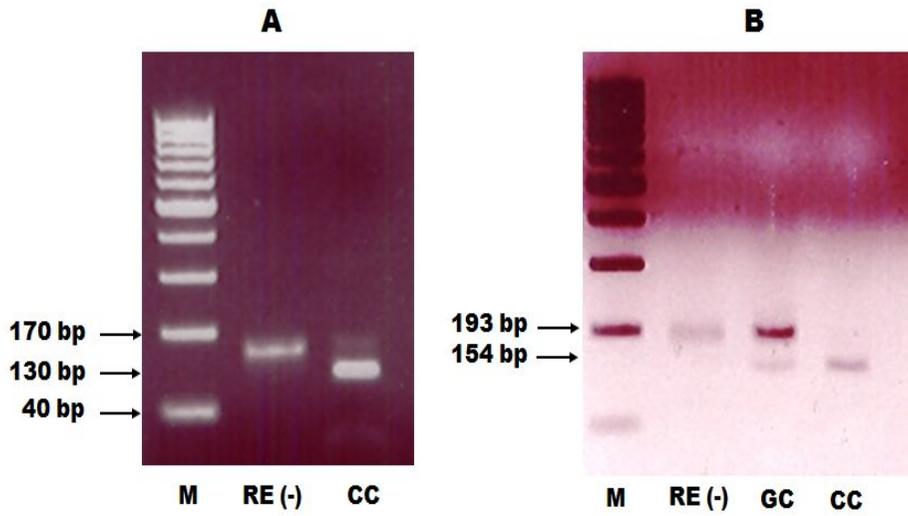


Fig. 1. The c.5998C>T (*TaqI*) SNP in the exon 4 (A) and c.970C>G (*Bstul*) SNP in the exon 6 (B) of SFRP3 gene.

9. 통계분석

모든 자료는 평균 \pm 표준오차로 표시하였다. Wnt 길항계 유전자내 다형성양상에 따른 각 유전자형에서 척추, 대퇴골경부, 대퇴돌기에서의 골밀도, 골교체의 생화학적 인자, 혈청 PTH, 칼시토닌, 칼슘 농도, 혈청 OPG 및 sRANKL의 비교에는 ANOVA, ANCOVA 검사, least significant difference post hoc 검사를 이용하여 분석하였고 Wnt 길항계 유전자 내 다형성양상에 따른 각 유전자형의 분포양상이 Hardy-Weinberg 비의 일치여부 분석 및 유전자형에 따른 골다공증 발생 위험 분석에는 χ^2 검사 또는 Fisher's exact 검사를 사용하였다. 일배체형 분석과 연관불균형 (linkage disequilibrium) 분석에는 SNP analyzer 1.2A (Istech, Goyang city, Korea)를 사용하였다. $p < 0.05$ 인 경우만 유의하게 판정하였으나 Bonferroni's correction이 필요시에는 $p < 0.025$ 인 경우를 유의하게 판정하였다.

결 과

1. 연구 대상의 인구학적 특성

연구 대상인 399명의 폐경여성의 평균 연령은 48.5 ± 5.0 세, 폐경 기간은 9.1 ± 7.2 년, 키 155.3 ± 4.8 cm, 몸무게 58.1 ± 6.9 kg, BMI 24.1 ± 2.8 kg/m² 이었다. 59명 (14.8%)에서 요추 골다공증이 있었고 29명 (7.3%)에서 대퇴골 골다공증이 있었으며 요추, 혹은 대퇴골 골다공증으로 진단되는 여성은 65명 (16.3%)이었다.

2. Wnt 길항계 유전자내 다형성 양상

WIF-1 유전자내 c.28G>A, c.496C>A, SFRP2 유전자내 c.-38C>G, c.134C>T, SFRP3 유전자내 c.598C>T, SFRP5 유전자내 c.34A>T, c.35C>A, DKK3 유전자내 c.92C>A, c.147G>T, c.706G>A 부위에서 SNP는 관찰되지 않았다. 즉, 염기서열 분석 결과 WIF-1 유전자내 c.28G>A의 G인자, c.496C>A의 C 인자, SFRP2 유전자내 c.-38C>G와 c.134 C>T의 C인자, SFRP3 유전자내 c.598C>T의 C인자, SFRP5 유전자내 c.34A>T의 A인자, c.35C>A의 C인자, DKK3 유전자내 c.92C>A의 C인자, c.147G>A의 G인자, c.706G>A의 G인자만이 있었다.

SFRP4 유전자 엑손 (exon) 6내 c.958C>A, c.1019G>A 다형성 부위의 염기서열분석은 각각 Fig. 2A, 2B와 같았으며 SFRP5 유전자의 엑손 1 내 c.29G>C 다형성 부위의 염기서열 분석은 Fig. 3과 같았다. Taqman 으로 측정한 SFRP1 유전자 rs3242C>T, rs168904444C>T 다형성 양상은 각각 Fig. 4A, 4B와 같았고 DKK1 유전자의 c.318A>G, DKK2 유전자의 c.437G>A, DKK3 유전자의

c.1003A>G 다형성 양상은 각각 Fig. 5A, 5B, 5C와 같았다.

DKK1 유전자의 c.318A>G, DKK2 유전자의 c.437G>A, DKK3 유전자의 c.1003A>G 다형성, SFRP1 유전자 rs3242C>T, rs16890444 C>T 다형성, SFRP3 유전자내 c.970C>G, SFRP4 유전자내 c.958 C>A, SFRP5 유전자내 c.20 G>C 다형성에 의한 유전자형의 분포는 Table 2와 같았고 SFRP5 유전자내 c.20G>C 다형성을 제외한 유전자 다형성에 따른 유전자형의 빈도는 Hardy-Weinberg의 공식을 따르는 것으로 나타났다. 연관불균형 분석을 시행하였을 때 SFRP1 rs3242C>T 다형성과 rs16890444 C>T 다형성 사이 및 SFRP4 유전자내 c.958C>A 다형성과 c.1019G>A 다형성 사이에 연관성이 있는 것으로 나타났다.

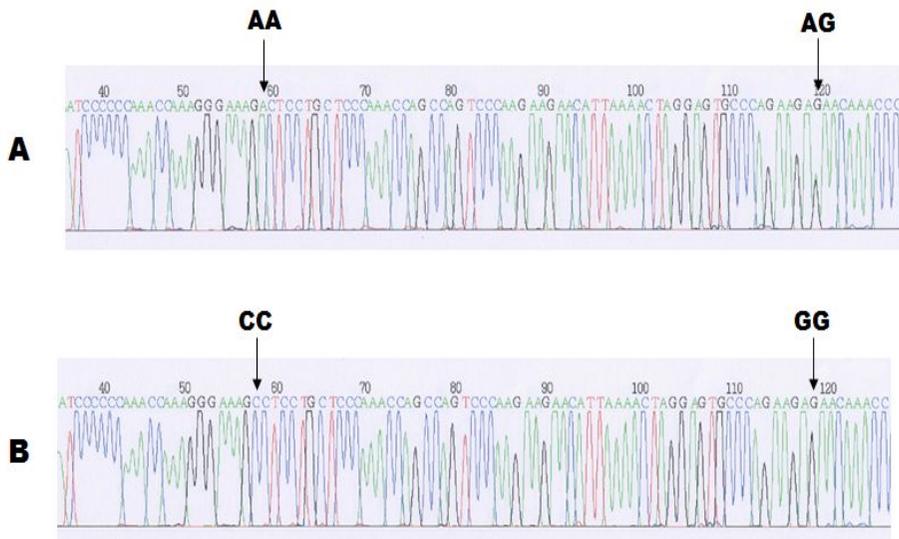


Fig. 2. Direct sequencing of c.958C>A SNP site (A) and c.1019G>A SNP site (B) in exon 6 of SFRP4 gene.

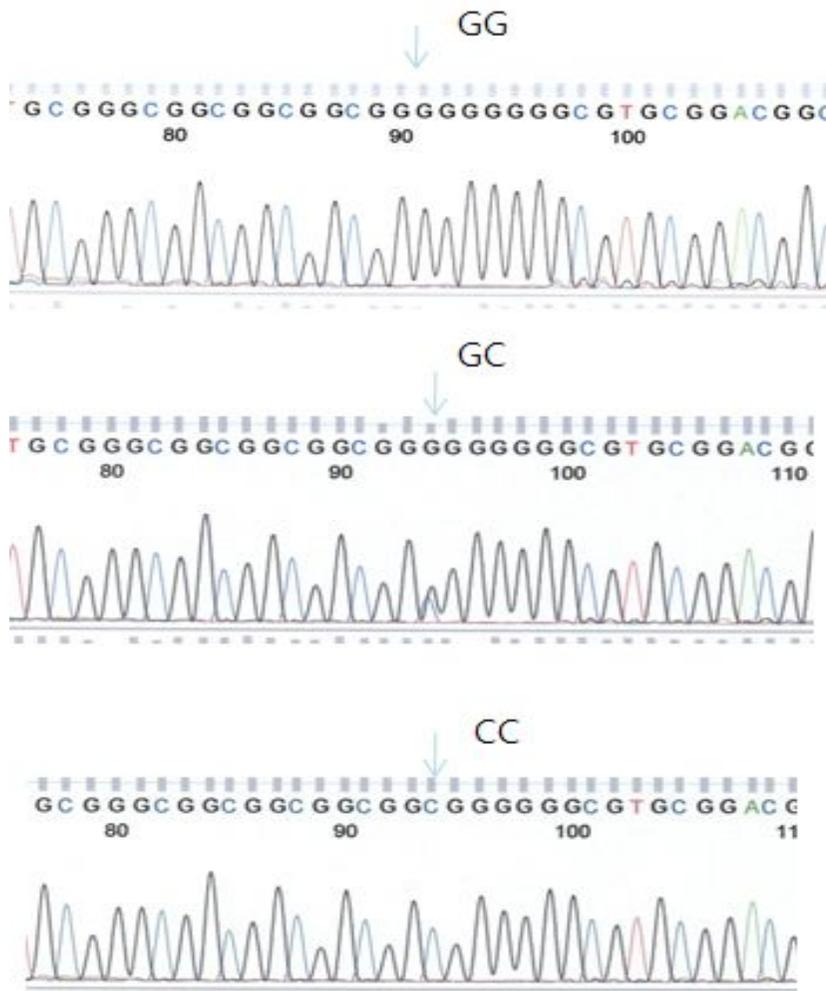


Fig.3. Direct sequencing of c.29G>C SNP in the exon 1 of SFRP5 gene.

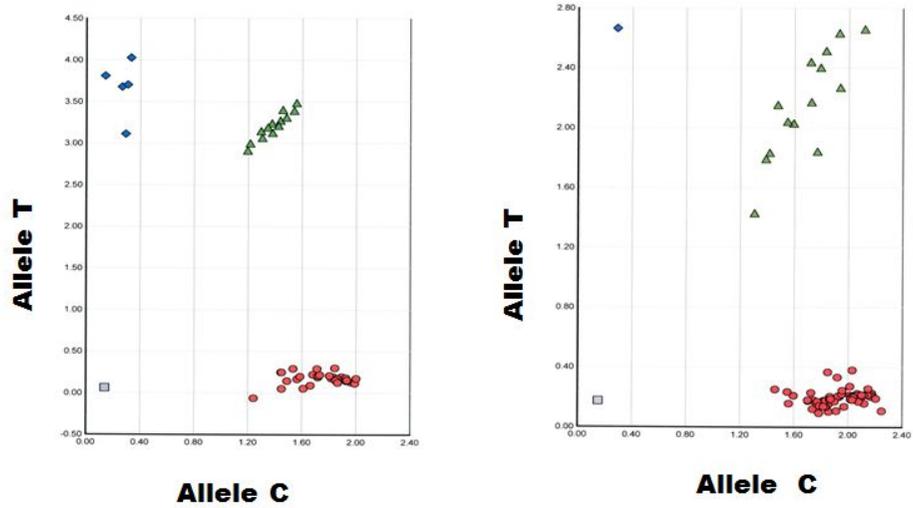


Fig. 4. Taqman assay of rs16890444C>T SNP and rs3242C>T SNP in SFRP1 gene.

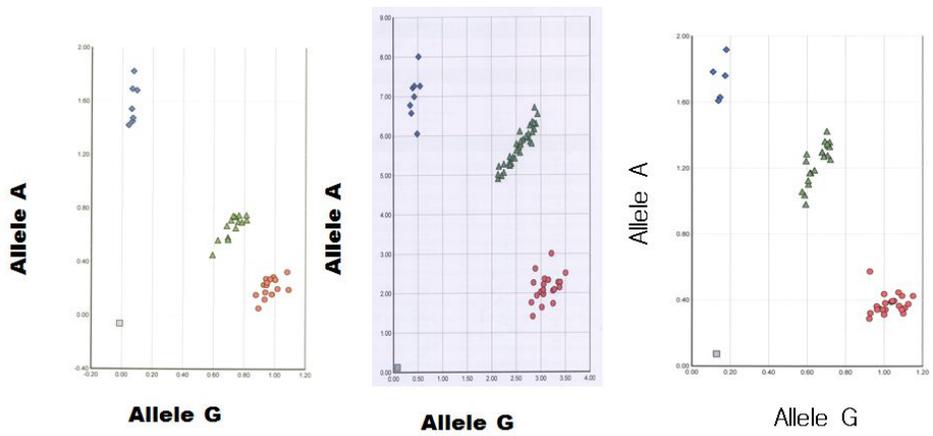


Fig. 5. Taqman assay of c.318A>G SNP in the exon 2 of DKK1 gene, c.437G>A SNP in the exon 3 of DKK2 gene and c.1003A>G SNP in the exon 6 of DKK3 gene.

Table 2. Genotype and allele frequencies at polymorphic sites.

Polymorphic sites	Genotype	Frequency	Allele frequency	χ^2 & P-value
DKK1 c.318A>G	GG	161 (40.4%)	G 0.64 A 0.36	$\chi^2 = 0.083$ $P = 0.77$
	GA	187 (46.9%)		
	AA	51 (12.8%)		
DKK2 c.437G>A	GG	130 (32.6%)	G 0.57 A 0.43	$\chi^2 = 0.086$ $P = 0.77$
	GA	198 (49.6%)		
	AA	71 (17.8%)		
DKK3 c.1003A>G	GG	243 (60.9%)	G 0.78 A 0.22	$\chi^2 = 0.081$ $P = 0.78$
	GA	138 (34.6%)		
	AA	18 (4.5%)		
SFRP1 rs16890444	CC	264 (66.2%)	C 0.81 T 0.19	$\chi^2 = 0.21$ $P = 0.90$
	CT	119 (29.8%)		
	TT	16 (4.0%)		
SFRP1 rs3242	CC	332 (83.2%)	C 0.91 T 0.09	$\chi^2 = 0.20$ $P = 0.90$
	CT	65 (16.3%)		
	TT	2 (.5%)		
SFRP3 c.970C>G	GC	5 (1.3%)	G 0.99 C 0.01	$\chi^2 = 0.02$ $P = 0.90$
	CC	394 (98.7%)		
	AA	108 (27.1%)		
SFRP4 c.958C>A	AC	207 (51.9%)	A 0.53 C 0.47	$\chi^2 = 0.68$ $P = 0.41$
	CC	84 (21.1%)		
	GG	236 (59.6%)		
SFRP4 c.1019G>A	GA	143 (36.1%)	C 0.78 A 0.22	$\chi^2 = 0.65$ $P = 0.72$
	AA	17 (4.3%)		
	GG	96 (24.1%)		
SFRP5 c.20G>C	GC	151 (37.8%)	G 0.43 C 0.57	$\chi^2 = 20.72$ $P = 0.001$
	CC	152 (38.1%)		
	GG	96 (24.1%)		

3. Wnt 길항계 유전자내 다형성과 골밀도 사이의 연관성

DKK1 유전자의 c.318A>G, DKK2 유전자의 c.437G>A, DKK3 유전자의 c.1003A>G 다형성에 따른 임상적 특성 및 골밀도 양상에는 차이가 없었으며(Table 3), SFRP1 유전자 rs3242C>T, rs16890444C>T 다형성에 따른 임상적 특성 및 골밀도 양상에도 차이가 없었다 (Table 4). SFRP3 유전자내 c.970C>G, sFRP4 유전자내 c.958C>A, SFRP5 유전자내 c.20G>C 다형성에 따른 각 유전자형에서의 임상적 특성 및 골밀도는 Table 5와 같았는데 SFRP5 유전자 c.20G>C 유전자 다형성의 GG 유전형에서 CC 유전자형보다 요추 골밀도가 낮았으나 ($p=0.03$) Bonferroni's correction을 시행했을 때 $p<0.025$ 가 유의한 수준이므로 결과적으로 Wnt 길항물질계 유전자형 변이에 따라서는 요추 및 대퇴 경부에서의 골밀도 차이가 없었다. 골밀도 상태에 따른 유전자형 변이 비교를 Table 6에 표시하였는데, 골다공증 여성과 정상 골밀도를 가진 여성 사이에 Wnt 길항물질계 유전자형 변이의 분포양상에는 차이가 없었다.

4. Wnt 길항계 유전자 내 다형성과 생화학적 인자 사이의 연관성

연령, 폐경기간, 체질량지표의 영향을 배제한 후에 DKK1 유전자 c.318A>G, DKK2 유전자 c.473G>A 다형성, DKK3 유전자 c.1003A>G 다형성 양상에 따른 혈청 BAP, CTX, OST, PTH, 칼슘 농도에는 차이가 없었으며 (Table 7), SFRP1 유전자 rs16890444C>T, rs3242C>T 유전자 다형성에 따라서 (Table 8), 그리고 sFRP3 유전자 c.970C>G 다형성 양상에 따라서도 (Table 9) 혈청 표지자의 농도에는 차이가 없었다. 그러나 SFRP4 유전자 내

c.958C>A 다형성의 CC 유전자형에서 AC 유전자형보다 혈청 CTX 농도가 낮았고 ($P<0.05$), sFRP5 유전자 내 c.20G>C 다형성의 GG 유전자형에서 다른 유전자형에 비하여 혈청 BAP 농도가 높았다 ($P<0.025$).

혈청 OPG, sRANKL, sRANKL/OPG 비는 Wnt 길항제 다형성양상에 따른 차이가 없었다 (Table 10).

Table 3. Clinical characteristics and bone mineral density in postmenopausal women in relation to DKK1 c.318A>G, DKK2 c.437G>A and DKK3 c.1003A>G SNPs.

	DKK1 c.318A>G			<i>P</i>	DKK2 c.437G>A			<i>P</i>	DKK3 c.1003A>G			<i>P</i>
	GG (n=161)	GA (n=187)	AA (n=51)		GG (n=130)	GA (n=198)	AA (n=71)		GG (n=243)	GA (n=138)	AA (n=18)	
Age (years)	57.3 ±0.5	57.7 ±0.5	58.6 ±0.9	0.44	57.5 ±0.5	57.3 ±0.4	58.8 ±0.9	0.25	57.8 ±0.4	57.3 ±0.5	58.3 ±1.6	0.68
Years since menopause	8.5 ±0.5	9.5 ±0.6	9.9 ±0.9		0.32	9.1 ±0.6	8.8 ±0.5		10.1 ±0.8	0.42	9.3 ±0.5	
Weight (kg)	58.8 ±0.6	57.4 ±0.5	58.5 ±0.9	0.18	58.5 ±0.6	58.1 ±0.5	57.3 ±0.8	0.53	57.8 ±0.4	58.3 ±0.6	60.8 ±1.4	0.17
Height (cm)	155.7 ±0.4	155.2 ±0.4	154.8 ±0.6		0.39	155.9 ±0.4	155.2 ±0.3		154.7 ±0.5	0.21	155.0 ±0.3	
BMI (kg/m ²)	24.3 ±0.2	23.9 ±0.2	24.4 ±0.4	0.28	24.1 ±0.2	24.1 ±0.2	24.0 ±0.4	0.93	24.1 ±0.2	24.0 ±0.2	25.1 ±0.7	0.33
BMD (g/cm ²)*												
Lumbar spine	0.999 ±0.013	1.011 ±0.014	1.022 ±0.024	0.68	1.012 ±0.016	1.018 ±0.013	0.972 ±0.020	0.18	1.014 ±0.012	0.995 ±0.014	1.030 ±0.038	0.53
Femoral neck	0.829 ±0.013	0.816 ±0.010	0.831 ±0.019		0.67	0.825 ±0.011	0.824 ±0.012		0.819 ±0.017	0.97	0.823 ±0.009	

Values are mean ± SE.

BMI=body mass index; BMD=bone mineral density

*: Values are adjusted for age, years since menopause, and BMI

P: ANCOVA

Table 4. Clinical characteristics and bone mineral density in postmenopausal women in relation to SFRP1 rs3242C>T and rs16890444C>T SNPs.

	SFRP1 rs3242C>T		<i>P</i>	SFRP1 rs16890444C>T			<i>P</i>
	CC (n=322)	CT+TT (n=67)		CC (n=264)	CT (n=119)	TT (n=16)	
Age (years)	57.8±0.4	56.7±0.8	0.21	57.7±0.4	57.3±0.6	59.3±1.5	0.51
Years since menopause	9.3±0.4	5.8±0.7	0.25	9.3±0.5	8.5±0.5	10.9±1.7	0.37
Weight (kg)	58.0±0.4	58.5±0.9	0.62	58.5±0.4	57.3±0.7	56.0±1.4	0.13
Height (cm)	155.1±0.3	156.5±0.5	0.02	155.5±0.3	154.8±0.4	155.7±1.1	0.37
BMI (kg/m ²)	24.1±0.2	23.9±0.4	0.56	24.2±0.2	23.9±0.3	23.1±0.6	0.21
BMD (g/cm ²)*			<i>p</i> *				<i>p</i> *
Lumbar spine	1.001 ±0.010	1.040 ±0.020	0.11	1.012 ±0.011	1.007 ±0.017	0.939 ±0.038	0.28
Femoral neck	0.822 ±0.008	0.831 ±0.014	0.66	0.826 ±0.010	0.823 ±0.012	0.781 ±0.034	0.51

Values are mean ± SE.

BMI=body mass index; BMD=bone mineral density

*: Values are adjusted for age, years since menopause, and BMI

P: Student's t-test *P**: ANCOVA

Table 5. Clinical characteristics and bone mineral density in postmenopausal women in relation to SFRP3 c.970C>G and SFRP5 c.20G>C SNPs.

	SFRP3 c.970C>G			SFRP4 c.958C>A				SFRP5 c.20G>C			<i>P</i> **
	GC	CC	<i>P</i>	AA	AC	CC	<i>P</i>	GG	GC	CC	
	(n=5)	(n=394)		(n=108)	(n=207)	(n=84)		(n=96)	(n=151)	(n=152)	
Age (years)	58.6 ±3.3	57.6 ±0.3	0.74	57.8 ±0.6	57.4 ±0.5	58.1 ±0.6	0.67	58.3 ±0.7	57.3 ±0.5	57.6 ±0.5	0.47
Years since menopause	8.2 ±3.68	9.1 ±0.36	0.77	9.4 ±0.77	9.0 ±0.49	9.2 ±0.68	0.88	10.2 ±0.93	8.5 ±0.56	9.0 ±0.48	0.19
Weight (kg)	52.2 ±3.14	58.2 ±0.35	0.75	56.4 ±0.59	58.6 ±0.49	59.0 ±0.78	0.009	57.9 ±0.64	57.7 ±0.58	58.6 ±0.58	0.50
Height (cm)	152.7 ±1.65	155.4 ±0.24	0.44	155.6±0 .44	155.4 ±0.34	154.9 ±0.53	0.64	154.9 ±0.57	155.6 ±0.38	155.3 ±0.36	0.60
BMI (kg/m ²)	22.4 ±1.12	24.1 ±0.14	0.76	23.3 ±0.25	24.3 ±0.20	24.6 ±0.31	0.003	24.2 ±0.27	23.8 ±0.23	24.1 ±0.14	0.34
BMD (g/cm ²)*			<i>p</i> *				<i>p</i> *				<i>p</i> **
Lumbar spine	0.915 ±0.1101	1.009 ±0.009	0.19	0.988 ±0.019	1.010 ±0.012	1.027 ±0.019	0.30	0.967 ±0.019 ^a	1.029 ±0.016 ^a	1.012 ±0.013	0.03
Femoral neck	0.742 ±0.0700	0.824 ±0.008	0.60	0.812 ±0.016	0.830 ±0.010	0.822 ±0.015	0.61	0.799 ±0.017	0.835 ±0.013	0.827 ±0.010	0.16

Values are mean ± SE.

BMI=body mass index; BMD=bone mineral density

*: Values are adjusted for age, years since menopause, and BMI

P: Student's t-test *P**: ANCOVA

***P*: *P* value higher than 0.025 are considered as not significant after Bonferroni's correction.

Table 6. Odds ratio for osteoporosis at lumbar spine and femoral neck according to single genotype.

Polymorphic sites	Genotypes	Osteoporosis		
		L-spine (n=59)	Femur neck (n=29)	LS and/or FN (n=65)
DKK1 c.318A>G	GG	1.31 (0.46-3.67)	1.80(0.38-8.39)	1.61 (0.58-4.47)
	GA	2.04 (0.76-5.53)	2.29(0.51-10.3)	2.19 (0.81-5.91)
	AA	1	1	1
DKK2 c.437G>A	GG	0.76 (0.35-1.66)	0.68 (0.24-1.91)	0.68 (0.32-1.43)
	GA	0.70 (0.34-1.46)	0.64 (0.25-1.68)	0.67 (0.33-1.33)
	AA	1	1	1
DKK3 c.1003A>G	GG	1	1	1
	GA	0.86 (0.45-1.62)	0.54(0.20-1.37)	0.78 (0.42-1.45)
	AA	0.67(0.15-3.26)	- (0)	0.58(0.13-2.79)
SFRP1 rs3242C>T	CC	2.41(0.88-7.15)	1.81(0.52-6.08)	2.20(0.06-5.93)
	CT+TT	1	1	1
SFRP1 rs16890444C>T	CC	1	1	1
	CT	0.85(0.45-1.75)	0.72(0.27-1.87)	0.75(0.39-1.46)
	TT	1.92(0.49-6.89)	0.77(0.10-6.07)	1.62(0.42-5.77)
SFRP3 c.970C>G	GC	3.94 (0.64-24.11)	9.06 (1.45-56.57)	3.50 (0.57-23.39)
	CC	1	1	1
	AA	2.81 (1.14-6.95)*	2.74 (0.86-8.73)	2.71 (1.15-6.40)*
SFRP4 c.958C>A	AC	1.86 (0.78-4.43)	1.23 (0.39-3.93)	1.80 (0.80-4.08)
	CC	1	1	1
	GG	1.52 (0.76-3.05)	2.09 (0.80-5.51)	1.56 (0.80-3.03)
SFRP5 c.20G>C	GC	1.07 (0.55-2.06)	1.41 (0.55-3.62)	1.06 (0.56-2.00)
	CC	1	1	1

Values are odds ratio (95% confidence interval) by chi-square test.

*: $P < 0.05$

Table 7. Serum bone turnover markers in postmenopausal women in relation to DKK1 c.318A>G, DKK2 c.437G>A and DKK3 c.1003A>G SNPs.

	DKK1 c.318A>G				DKK2 c.437G>A				DKK3 c.1003A>G			
	GG (n=129)	GA (n=160)	AA (n=43)	<i>P</i>	GG (n=110)	GA (n=165)	AA (n=58)	<i>P</i>	GG (n=199)	GA (n=116)	AA (n=18)	<i>P</i>
BAP (U/L)	18.5±1.0	17.0±0.6	16.1±1.0	0.23	17.9±0.8	18.0±0.8	15.2±1.0	0.09	17.6±0.6	17.1±0.9	18.2±2.5	0.81
CTX (pM/L)	1693.5 ±163.8	1518.2 ±113.0	1359.0 ±247.8	0.45	1503.0 ±143.3	1716.3 ±142.5	1504.2 ±296.1	0.56	1598.7 ±134.1	1652.4 ±159.1	1662.4 ±370.9	0.93
OST (ng/ml)	14.6±0.6	14.5±0.6	12.8±1.0	0.26	13.8±0.6	14.8±0.6	13.8±0.8	0.41	14.2±0.5	14.5±0.6	14.4±1.9	0.90
PTH (pg/ml)	11.3±0.8	11.1±0.7	10.0±1.7	0.74	10.4±0.9	11.6±0.7	10.6±1.2	0.56	11.7±0.7	10.5±0.7	7.5±1.4	0.14
Calcitonin (pg/ml)	4.6±0.6	6.1±0.6	3.6±0.5	0.050	6.1±0.9	5.0±0.5	4.2±0.5	0.18	4.9±0.4	5.9±0.8	3.9±0.6	0.35
Ca (mg/dL)	9.4±0.3	9.0±0.1	9.0±0.2	0.49	9.3±0.4	9.1±0.2	9.2±0.1	0.85	9.1±0.1	9.4±0.4	8.8±0.2	0.56

Values are mean ± SE.

BAP=bone alkaline phosphatase; CTX=carboxy-terminal telopeptide of type I collagen; OST=osteocalcin PTH=parathyroid hormone; Ca=calcium;

P: ANCOVA

Table 8. Serum bone turnover markers in postmenopausal women in relation to SFRP1 rs16890444C>T and rs3242C>T SNPs

	SFRP1 rs3242C>T			SFRP1 rs16890444C>T			<i>P</i>
	CC (n=262)	CT+TT (n=54)	<i>P</i>	CC (n=205)	CT (n=96)	TT (n=15)	
BAP (U/L)	17.6±0.6	16.9± 0.9	0.63	16.9±0.5	18.7±1.1	16.5±1.4	0.26
CTX (pM/L)	1653.7 ±114.5	1400.8 ±175.7	0.33	1639.7 ±113.4	1603.2 ±212.8	1213.1 ±192.2	0.68
OST (ng/ml)	14.3±0.4	14.7± 0.9	0.59	14.4±0.5	14.4±0.7	13.0±1.2	0.74
PTH (pg/ml)	11.0±0.6	11.3 ±1.4	0.79	10.9±0.6	10.9±0.9	13.9±3.1	0.46
Calcitonin (pg/ml)	5.3±0.4	4.6± 0.6	0.50	4.7±0.4	6.4±0.9	3.6±0.4	0.07
Ca (mg/dL)	9.2±0.2	8.8± 0.2	0.25	9.2±0.2	9.1±0.1	8.9±0.3	0.86

Values are mean ± SE.

BAP=bone alkaline phosphatase; CTX=carboxy-terminal telopeptide of type I collagen; OST=osteocalcin; PTH=parathyroid hormone; Ca=calcium

p: ANCOVA

Table 9. Serum bone turnover markers in postmenopausal women in relation to SFRP3 c.970C>G and SFRP5 c.20G>C SNPs.

	SFRP3 c.970C>G			SFRP4 c.958C>A				SFRP5 c.20G>C			
	GC	CC	<i>P</i>	AA	AC	CC	<i>P</i>	GG	GC	CC	<i>P</i> *
	(n=5)	(n=328)		(n=93)	(n=175)	(n=65)		(n=82)	(n=122)	(n=129)	
BAP (U/L)	16.1±3.27	17.5±0.50	0.93	18.6±1.29	17.2±0.53	16.4±0.95	0.30	19.8±1.41 _{ab}	16.3±0.61 ^a	17.0±0.65 ^b	0.02
CTX (pM/L)	2188.8 ±1105.92	1595.3 ±99.7	0.47	1539.3 ±167.88	1815.3 ±156.29 ^a	1152.9± 141.21 ^a	0.038	1748.7 ±196.59	1520.3 ±153.65	1603.8 ±170.53	0.68
OST (ng/ml)	15.82±1.34	14.3±0.38	0.17	14.3±0.76	14.4±0.49	14.0±0.86	0.93	14.9±0.85	13.6±0.54	14.6±0.60	0.32
PTH (pg/ml)	16.7±4.66	10.9±0.52	0.93	11.2±1.04	10.9±0.68	11.1±1.22	0.97	12.7±1.14	10.4±0.86	10.4±0.74	0.14
Calcitonin (pg/ml)	7.1±3.74	5.2±0.38	0.38	5.2±0.74	5.7±0.59	4.1±0.51	0.24	5.8±0.82	3.9±0.24	5.7±0.71	0.06
Ca (mg/dL)	9.2±0.55	9.2±0.15	0.85	9.1±0.11	9.3±0.27	9.0±0.18	0.67	9.0±0.13	9.1±0.09	9.4±0.37	0.49

Values are mean ± SE.

BAP=bone alkaline phosphatase; CTX=carboxy-terminal telopeptide of type I collagen; OST=osteocalcin; PTH=parathyroid hormone; Ca=calcium

P: ANCOVA

a, b: *P* < 0.05 by LSD test

*: *P* value higher than 0.025 are considered as not significant after Bonferroni's correction

Table 10. Serum levels of OPG, and RANKL in postmenopausal women in relation to polymorphic sites.

		No	OPG	RANKL	RANKL ^{X1000} /OPG
DKK1 c.318A>G	GG	79	8832.8±286.5	6.9±0.5	0.8±0.0
	GA	103	9161.4±225.6	8.3±0.8	0.9±0.1
	AA	29	10002.8±848.2	6.5±0.4	0.8±0.1
	<i>P</i> *		0.16	0.25	0.58
DKK2 c.437G>A	GG	74	9055.7±309.0	7.7±0.7	0.9±0.1
	GA	100	9182.1±300.2	7.5±0.7	0.9±0.1
	AA	37	9274.7±428.2	7.1±0.9	0.8±0.1
	<i>P</i> *		0.92	0.91	0.80
DKK3 c.1003A>G	CC	139	9271.1±238.4	8.0±0.7	0.9±0.1
	CA	63	8984.3±354.8	6.7±0.5	0.8±0.1
	AA	9	8533.9±946.4	6.4±0.4	0.9±0.1
	<i>P</i> *		0.64	0.41	0.79
SFRP1 rs3242C>T	CC	176	9256.0±207.7	7.2±0.4	0.8±0.04
	CT+TT	35	8641.2±513.3	9.3± 1.8	1.2± 0.21
	<i>P</i>		0.24	0.27	0.12
SFRP1 rs16890444C>T	CC	139	9198.3±232.9	7.4±0.5	0.8±0.05
	CT	66	9198.4±345.3	7.8±0.9	0.9±0.09
	TT	6	7638.7±1710.0	6.5±0.6	1.5±0.50
	<i>P</i> *		0.41	0.84	0.17
SFRP3 c.970C>G	GC	2	8212.6±758.34	7.3±2.04	0.9±0.33
	CC	209	9163.0±194.86	7.5±0.46	0.9±0.05
	<i>P</i>		0.27	0.89	0.74
SFRP4 c.958C>A	AA	58	9028.5±355.95	8.0±1.03	1.0±0.13
	AC	114	9384.2±264.75	7.1±0.48	0.8±0.04
	CC	39	8667.8±461.65	8.0±1.35	1.0±0.14
	<i>P</i> *		0.36	0.62	0.14
SFRP5 c.20G>C	GG	52	9459.7±391.77	8.7±1.30	1.0±0.14
	GC	78	8869.4±283.9	7.3±0.63	0.8±0.05
	CC	81	9231.8±340.39	7.0±0.59	0.8±0.07
	<i>P</i> *		0.48	0.33	0.34

Values are mean ± SE.

P: Student's t-test

*P**: ANCOVA

5. SFRP1 일배체형 유전자형, SFRP4 일배체형 유전자형과 골밀도 사이의 연관성

Table 11에 표시한 바와 같이 SFRP1 유전자 내 rs3242C>T, rs16890444C>T 다형성 양상을 복합하였을 때 4 종류의 일배체형 대립인자가 존재하는데, CC가 75.6%, CT 20.9%, TT 3.1%, TC 0.4%였다. 이러한 일배체형으로 구성된 유전자형은 7 가지가 있었는데 CC-CC [1,1]이 55.6%로 가장 많았고 그 다음이 CC-CT [1,2] 35.0%, CC-TT [1,4] 4.8% 순이었다. SFRP4 유전자내 c.958 C>A 다형성과 c.1019G>A 다형성 양상을 복합한 경우에도 4 종류의 일배체형 대립인자가 존재하는데, AG가 31.1%, AA가 21.9%, CG가 46.7%, CA가 0.3%였다 (Table 12). 이러한 일배체형으로 구성된 유전자형에는 8 가지가 있었는데 AG-CG [1,3]가 31.3%로 가장 많았고 그 다음이 CG-CG [3,3] 20.8%, AA-CG [2,3] 20.3%, AA-AG [2,1] 15.3% 순이었다.

SFRP1 일배체형 유전자형과 골밀도 사이에 연관성이 없었으나 SFRP4 AA-AA 일배체형 유전자형에서 요추의 골밀도가 가장 낮았고 ($P<0.05$, Table 13), AA-AA 유전자형이 요추에서의 골다공증 여성에서 정상 골밀도 여성보다 4.37배 (95% CI 1.48-12.91, $p<0.05$) 더 빈번히 관찰되었다 (Table 14).

6. SFRP1 일배체형 유전자형과 SFRP4 일배체형 유전자형과 생화학적 인자의 연관성

Table 15에 표시한 바와 같이 연령, 폐경기간, 체질량지표의 영향을 배제한 후에 SFRP1의 CC 일배체형 대립유전자를 가지지 않은 동형유전자형에서 sRANKLx1000/OPG 비가 높다는 점을 제외

하고 SFRP1 일배체형 유전자형에 따른 다른 생화학적 인자의 농도 차이는 없었다.

SFRP4 AA-AA 일배체형 유전자형에서 혈청 BAP농도가 가장 높았으나 ($P<0.01$) 다른 골교체인자 및 혈청 OPG와 sRANKL 농도와 그 비는 SFRP4 일배체형 유전자형에 따른 차이가 없었다.

Table 11. The SFRP1 rs3242C>T and rs16890444C>T haplotype and genotype frequencies.

Haplotype		Frequencies			Genotype	Frequencies		
SFRP1 rs3242C>T	SFRP1 rs16890444	Code	No*	%		Code	No**	%
C	C	1	603	75.6	CC-CC	[1, 1]	222	55.6
C	T	2	167	20.9	CC-CT	[1, 2]	140	35.0
T	C	3	3	0.4	CC-TT	[1, 4]	19	4.8
T	T	4	25	3.1	CT-CT	[2, 2]	11	2.7
					CT-TT	[2, 4]	5	1.3
					TC-TC	[3, 3]	1	0.3
					TC-TT	[3, 4]	1	0.3
		Total	798	100		Total	399	100

*: Number of chromosomes, **: Number of women

Table 12. The SFRP4 c.958C>A and c.1019G>A haplotype and genotype frequencies.

Haplotype		Frequencies			Genotype	Frequencies		
SFRP4 c.958C>	SFRP4 c.1019G>	Code	No*	%		Code	No**	%
A	A							
A	G	1	248	31.1	AG-AG	[1, 1]	31	7.8
A	A	2	175	21.9	AG-CG	[1, 3]	125	31.3
C	G	3	373	46.7	AA-AG	[2, 1]	61	15.3
C	A	4	2	0.3	AA-AA	[2, 2]	16	4.0
					AA-CG	[2, 3]	81	20.3
					AA-CA	[2, 4]	1	0.3
					CG-CG	[3, 3]	83	20.8
					CA-CG	[4, 3]	1	0.3
		Total	798	100		Total	399	100

*: Number of chromosomes, **: Number of women

Table 13. Demographic data and bone mineral density in postmenopausal women in relation to SFRP1 rs3242C>T and rs16890444C>T haplotype genotype.

	SFRP1 haplotype			<i>P</i>	SFRP4 haplotype			<i>P</i>
	[1,1] (n=222)	[1,other] (n=159)	[other,other] (n=18)		[2,2] (n=16)	[2,other] (n=142)	[other,other] (n=241)	
Demographic data								
Age (years)	57.9±0.4	57.1±0.5	59.4±1.4	0.23	58.8±1.2	57.6±0.6	57.6±0.4	0.76
years since menopause	9.5±0.5	8.3±0.5	11.1±1.7	0.12	10.9±1.2	8.6±0.6	9.3±0.5	0.36
Height (cm)	155.4±0.3	155.1±0.4	155.8±1.0	0.74	157.2±1.4	155.4±0.4	155.2±0.3	0.25
Weight (kg)	58.5±0.4	57.7±0.6	56.5±1.3	0.30	55.1±1.1	58.1±0.6	58.3±0.5	0.20
BMI (kg/m ²)	24.2±0.2	24.0±0.2	23.2±0.5	0.29	22.4±0.6 ^{a,b}	24.1±0.2 ^a	24.2±0.2 ^b	0.04
BMD (g/cm ²)								
Lumbar spine	1.004 ±0.012	1.019 ±0.014	0.945 ±0.034	0.23	0.895 ±0.047 ^{c,d}	1.012 ±0.016 ^c	1.013 ±0.011 ^d	0.038
Femoral neck	0.823 ±0.011	0.829 ±0.010	0.783 ±0.031	0.46	0.766 ±0.036	0.826 ±0.015	0.826 ±0.008	0.28

[1,1]: CC/CC

[1,other]: CC/other

[other,other]: other/other

[2,2]: AA/AA

[2,other]: AA/other

[other,other]: other-other

BMI= body mass index, BMD= bone mineral density

P: ANCOVA

a,b,c,d: *P* < 0.05 by LSD test

Table 14. Odds ratio for osteoporosis at lumbar spine and femoral neck according to SFRP1 rs3242C>T and rs16890444C>T haplotype genotypes.

		Osteoporosis		
		L-spine (n=59)	Femur neck (n=29)	LS or FN (n=65)
SFRP1 haplotype genotypes				
[1, 1]	CC-CC	0.67(0.19-2.58)	1.49(0.19-11.8)	0.79(0.23-3.01)
[1, other]	CC-other	0.48(0.13-1.92)	1.15(0.14-9.57)	0.51(0.14-2.04)
[other, other]	other-other	1	1	1
SFRP4 haplotype genotypes				
[2, 2]	AA-AA	4.37 (1.48-12.91)*	2.71 (0.55-13.33)	3.76 (1.28-11.05)**
[2, other]	AA-other	1.47 (0.82-2.64)	1.92 (0.82-4.50)	1.39 (0.79-2.44)
[other, other]	other-other	1	1	1

Values are odds ratio (95% confidence interval) by chi-square test.

**P* value: 0.0153

Table 15. Serum levels of bone turnover markers, OPG, and sRANKL in postmenopausal women in relation to SFRP4 haplotype genotype

	SFRP1 haplotype genotype			<i>P</i>	SFRP4 haplotype genotype			<i>P</i>
	[1,1]	[1,other]	[other,other]		[2,2]	[2,other]	[other,other]	
Serum bone turnover marker	(n=177)	(n=139)	(n=17)		(n=12)	(n=127)	(n=194)	
BAP (U/L)	17.1±0.6	17.9±0.9	16.8±1.3	0.70	25.7±6.2 _{a,b}	16.9±0.6 _a	17.2±0.5 ^b	0.001
CTX (pM/L)	1650.4 ±126.6	1607.0 ±173.7	1191.7 ±171.1	0.61	2731.7± 951.0	1539.6 ±133.2	1585.0 ±134.0	0.09
OST (ng/ml)	14.3±0.5	14.4±0.6	13.7±1.2	0.94	17.2±2.5	14.2±0.6	14.2±0.5	0.26
PTH (pg/ml)	11.0±0.7	10.6±0.8	14.9±2.8	0.19	9.4±2.0	11.2±0.8	11.1±0.7	0.79
Calcitonin	4.7±0.4	5.8±0.7	4.6±1.1	0.33	4.1±0.5	5.2±0.6	5.3±0.5	0.75
Ca (mg/dL)	9.4±0.3	8.9±0.1	8.9±0.3	0.33	9.3±0.2	9.3±0.3	9.1±0.1	0.84
Serum OPG-RANKL	(n=120)	(n=84)	(n=7)		(n=9)	(n=75)	(n=127)	
sOPG (ng/ml)	9172.1 ±256.1	9238.2 ±297.0	7833.9 ±1458.4	0.45	10270.4 ±788.7	8985.6 ±297.4	9174.3 ±262.7	0.43
sRANKL (pg/ml)	7.0±0.4	7.7±0.8	13.1±6.6	0.07	9.8±4.1	7.9±0.8	7.2±0.5	0.47
sRANKL ^{x1000} /OPG	0.8±0.05 ^a	0.9±0.07 ^b	2.2±0.83 ^{a,b}	0.001	1.0±0.4	0.9±0.1	0.9±0.1	0.82

Values are mean ± SE.

BAP=bone alkaline phosphatase; CTX=carboxy-terminal telopeptide of type I collagen; OST=osteocalcin; PTH=parathyroid hormone; Ca=calcium

P: ANCOVA

a, b: *P* < 0.05 by LSD test

고찰

Wnt 신호계는 조골세포의 생성이나 파골세포에 의한 골 흡수를 조절하여 골량 조절에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. (10,11,64,65) Wnt 신호를 조절하는 세포외 길항제는 크게 두 분류로 나누어진다. 두 종류 모두 리간드와 수용체간 상호작용을 막아 작용하지만 작용 기전이 다른데 sFRP, WIF-1, Cerberus 등은 Wnt 단백질에 결합하여 작용하고 Dkk는 Wnt 수용체 복합체의 하부단위 (subunit)에 결합하여 작용한다. (29) 이들 길항제의 정확한 작용 기전이나 골다공증에 있어서 유전적 차이는 명확히 알려져 있지 않아 본 연구에서는 이들 길항제 유전자의 19개 부위의 다형성과 골밀도, 골다공증과의 연관성을 보고자 하였다.

본 연구에서 분석한 유전자의 19개 부위 중 10개에서는 한국인에서 다형성이 발견되지 않았다. 이 중 WIF-1 유전자의 c.28G>A와 c.496C>A, SFRP2의 c.-38C>G, SFRP5 유전자의 c.34A>T, c.35C>A, DKK3 유전자의 c.92C>A, c.706G>A는 지금까지 다른 인종에서 다형성 빈도가 분석된 바 없는 부위이다. DKK3 유전자의 c.147G>T 부위는 유럽인이나 아시아인, 아프리카인 모두에서 다형성이 없었으며 (NCBI assay ID: rs16240973) 한국인에서도 관찰되지 않았다. SFRP2 유전자의 c.134C>T 다형성은 백인이나 아프리카인에서는 다형성이 보고되나 중국인에서는 다형성이 보이지 않았고 일본인에서는 A대립인자의 빈도가 0.024의 빈도로 보고된 바 있으나 (NCBI assay ID: rs42182750) 한국인에서는 다형성이 관찰되지 않았다. SFRP3 유전자의 c.598C>T 부위는 지금까지 유럽이나 아프리카인에서 다형성이 보고되었으며 주로 골관절염과의 관계가 연구되었다. (66-68) 골량에 대해서는 중국인에서 영향이 없다고 보고되

었으며 (57) 본 연구에서는 한국인에서 다형성이 관찰되지 않았다. 지금까지 DKK3, SFRP2, SFRP5 유전자 다형성과 골밀도와의 관련성은 연구된 바 없으며 상기 다형성부위는 한국인에서 최초로 분석된 것으로 다형성은 관찰되지 않았지만 앞으로 한국인이나 동양인에서의 유전연구에 참고자료로 사용될 수 있다.

본 연구에서 SFRP4 유전자 내 c.958C>A와 c.1019G>A 다형성 양상에 의한 일배체형만이 골밀도나 골다공증의 위험과 연관성을 보였다. SFRP4는 7p14.1에 존재한다. 본 연구 결과 SFRP4 c.958C>A 다형성에서 CC 유전자형의 빈도는 21.1%로서 일본인에서 보고된 18%와 유사하였고, (69) 덴마크인 남성에게의 36.2%보다는 낮았다. (71) 한국 폐경 여성에서 SFRP4 c.1019G>A가 골밀도와 연관성을 보인바 있는데, (58) 본 연구에서는 c.958C>A 다형성을 함께 분석한 결과 c.958C>A 다형성이 골다공증의 빈도와 연관성을 보였고 c.1019G>A와 c.958C>A 부위의 일배체형 분석 결과 AA 동형접합체 (homozygote)가 유의하게 낮은 요추 골밀도와 높은 혈청 BAP 농도를 보였다. 또한 요추에서의 골다공증 위험이 4.37배 증가하는 소견도 보였다. 이러한 결과는 두 부위 다형성의 연관불균형 분석 결과 연관성을 보이는 것으로 설명된다. c.958C>A 부위의 다형성은 1,383명의 덴마크 남성을 대상으로 한 연구에서 키, 체지방, 대퇴경부 골밀도와 연관성을 보인 바 있다. 하지만 벨기에 남성들에게선 이러한 연관성이 보이지 않았다. (70) 이 부위는 일본인에서 신장암의 위험과 분석했을 때 관련이 없었고 (69) Cho 등 (71)은 SFRP4 유전자의 다른 부위인 rs1721400 부위의 다형성이 한국인에서 골밀도와 연관성을 보인다고 하였다. 따라서 본 연구는 SFRP4 c.958C>A와 c.1019G>A 사이의 일배체형과 골밀도 사이의 연관성을 보인 최초의 연구로서 한국인에서 SFRP4 유전자가 골량 결정에

중요한 역할을 가짐을 시사한다.

SFRP4 유전자 다형성이 골량 결정에 어떻게 작용하는지는 아직 불분명하다. 일반적으로 유전자 다형성은 유전자 기능에 영향을 주거나, mRNA 전사 과정에 영향을 주어 기능적 이상을 유발하거나 다른 결정적 기능을 주관하는 다형성 부위와 연관불균형을 통해 질병과 연관성을 보일 수 있다. 본 연구에서 분석된 c.958C>A와 c.1019G>A 부위는 모두 코딩 부위 (coding lesion)로서 Pro320Thr, Arg340Lys 부위이다. 이들 아미노산 변화가 sFRP4 단백질 기능에 영향을 미쳤을 가능성도 있다.

Berndt 등 (72)은 sFRP4가 신장에서 Wnt 신호계 길항작용을 통해 나트륨의존성 인산염 수송을 억제하여 인산염요증을 유발한다고 하였다. 이러한 무기인산염의 재흡수 저하에 따른 인산염요증은 PTH 비의존성으로 나타나고 보상기전인 1,25(OH)vitamin D 증가도 나타내지 않았다. 하지만 Sfrp4 유전자를 제거한 쥐에서는 요중 인산염 농도에 변화가 없고 골량에도 차이를 보이지 않는 결과로 보아 장기적인 인산염 농도 조절 기능은 없는 것으로 보인다. (73) 조골세포에서의 sFRP4의 과발현은 조골세포의 증식을 억제하고 골형성의 저하를 유발하며 canonical Wnt 신호계를 활성화시킬 경우 골량이 회복되는 현상을 보이고, (74) canonical Wnt 신호 억제를 통해 비타민 D 대사에도 관여한다고 알려져 있다. (29) 이와 같은 결과들은 sFRP4가 다양한 경로를 통해 골량을 결정한다는 것을 의미한다.

SFRP5 유전자의 c.20G>C 다형성 부위는 본 연구에서 Hardy-Weinberg 공식을 따르지 않는 것으로 나타났는데 이는 유전자형 분석 과정의 오류나 연구 대상군 선정의 오류, 유전체 내 동종

부위 (homologous region)의 존재 등이 원인이 될 수 있다. 다른 부위의 다형성 부위에서는 Hardy-Weinberg 공식을 따르는 것으로 보아 연구 대상군의 문제일 가능성은 적고, 분석 과정의 오류는 확인 시 문제가 없었으며 유전체 내 동종 부위가 존재하는 지에 대한 추가적인 확인이 필요할 것으로 보인다. 이 부위의 다형성은 아직 다른 인종에서의 다형성 빈도도, 질환과의 연관성도 알려져 있지 않다. sFRP5는 비만 기전에서도 연구된 바 있고 (55) 고지방 식이를 지속시킬 경우 지방세포 (adipocyte)에서 발현율이 증가하는 결과를 보인만큼 비만과 지방세포와 골과의 연관성을 연구하는 데에도 중요한 의미를 가질 수 있다. (75) 하지만 본 연구에서 다형성 양상에 따라 환자군의 체질량지수에는 차이가 없었다.

본 연구에서 관찰된 SFRP1, SFRP3, DKK 유전자 다형성 부위는 골밀도나 골다공증, 골교체인자와의 연관성을 보이지 않았다. SFRP1은 염색체 8p12-p11.1, sFRP2는 4q31.3, sFRP3은 2q31-q33에 존재한다. 다형성이 관찰된 SFRP3 유전자의 c.970C>G 부위는 골관절염과의 연관성에 대해 연구된 바 있다. (68,76) 본 연구에서 골밀도나 골교체인자, 골다공증의 빈도와 연관성을 보이지 않았는데 이는 벨기에 여성에서 골반골절율과 관련 없음을 보인 연구나, (59) SFRP1 유전자의 다른 부위의 다형성 (rs9288087, rs2242070, rs7775)이 미국 백인 여성에서 골밀도나 골다공증성 골절과 관련성이 없음을 보인 연구 결과, (77) 일본인에서 rs16890444 다형성은 요추나 골반 골밀도와 연관을 보이지 않은 결과와 유사한 것이다. (60) 하지만 일본인에서 rs3242 다형성이 대퇴경부 골밀도와 연관성을 보였고, (60) Sims 등 (62)이 호주인에서 rs921142, rs4736965 부위의 다형성이 골밀도와 연관성을 보임을 밝힌바 있다. 이번 연구 결과에서 나타난 SFRP1 다형성의 일배체형에 따른 혈청

sRANKL/OPG 비의 유의한 차이가 어떠한 임상적 의의를 가지는지는 불명확하다. sFRP1이 조골세포나 골세포의 생존에 중요한 역할을 하는 만큼 (35) 연구 대상이 된 다형성이 골대사에 중요한 영향을 줄 것으로 예상할 수도 있겠지만 골밀도나 골다공증의 빈도와는 연관이 없는 것으로 보아 일시적인 골대사의 반영일 뿐일 수도 있다.

SFRP3 유전자는 rs4666865 부위의 다형성이 스페인 폐경 여성에서 골밀도와 연관성을 보인바 있으나 (63) 중국인에서는 최대 골량과 관련이 없는 것으로 보고된 바 있다. (57) 본 연구와 같은 부위의 SFRP3 유전자 다형성을 분석한 Gordon 등 (76)은 이 부위의 다형성이 골반관절 수술 (total hip arthroplasty) 후 골용해 (osteolysis)나 이소골화 (heterotopic ossification)와 관련 있음을 보인바 있고, 골반의 골다공증 빈도와 연관 있음이 보고된 바 있다. (59) 하지만 한국인에서는 골밀도나 골다공증의 빈도와 연관이 없는 것으로 나타나 인종간의 차이를 확인할 수 있었다.

다형성이 관찰된 부위 중 DKK1 c.318A>G, DKK2 c.437G>A, DKK3 c.1003A>G는 인종 간 다양한 다형성 빈도를 보고한 바 있으나 (NCBI assay ID: rs52074151; rs48417856, rs68907362; rs23574960, rs88467985) 질환과의 연관성은 불분명한 부위로 본 연구에서 골밀도나 골다공증의 빈도와 연관성을 보이지 않았다. DKK1은 염색체 10q21.1, DKK2는 4q25, DKK3는 11q15.2에 존재하는데 DKK1 유전자의 다형성은 덴마크인에서도 골밀도나 골교체인자와 연관 없음이 보고된 바 있다. (60) DKK2 유전자의 c.437G>A 다형성은 GG 유전자형의 빈도가 32.6%로 일본인에서 보고된 53%에 비해 낮게 나타났으며 (68) 호주 여성에서 골밀도와 연

관성을 보인 것 (61)과 달리 골밀도나 골다공증의 빈도와 관련이 없었다. Dkk3는 Wnt 신호에 영향을 주지 않는 것으로 알려져 있는데 (11,30) 본 연구 결과에서도 유전자 다형성이 골밀도나 골다공증의 빈도와는 연관성을 보이지 않았다.

본 연구는 몇 가지 제한점을 가지고 있다. 첫째로 단일 의료기관을 방문한 폐경여성을 대상으로 하였고 둘째로 대상 환자 수가 적으며 셋째로 흡연이나 운동량 등 골밀도에 영향을 주는 생활습관 인자가 보정되지 않았다는 점이다. 하지만 상대적으로 연구 결과가는 Wnt 신호체계 억제인자의 유전자 다형성과 폐경여성에서 골밀도와의 관계를 최초로 분석한 연구라는 의의가 있다. 앞으로 더 큰 규모의 연구에서 해당 유전자의 골밀도에 대한 영향에 대한 추가적인 연구와 그 기전을 밝힐 수 있는 연구가 필요하다.

결론적으로 한국 폐경 여성에서 SFRP4 유전자 c.958C>A, c.1019G>A 다형성의 일배체형 AA 동형접합자가 요추 골다공증의 빈도가 높고 혈청 BAP 농도가 높으며 요추 골다공증의 위험이 4.37 배 증가하는 결과를 보였다. 이는 이 부위의 다형성이 한국 폐경여성에서 요추 골량 결정에 중요한 역할을 한다는 의미일 수 있다.

참 고 문 헌

1. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. JAMA 2001 Feb;285(6):785-95.
2. Jouanny P, Guillemin F, Kuntz C, Jeandel C, Pourel J. Environmental and genetic factors affecting bone mass. Similarity of bone density among members of healthy families. Arthritis Rheum 1995 Jan;38(1):61-7.
3. Gong G, Haynatzki G. Association between bone mineral density and candidate genes in different ethnic populations and its implications. Calcif Tissue Int 2003 Feb;72(2):113-23.
4. Ralston SH, Uitterlinden AG. Genetics of osteoporosis. Endocr Rev 2010 Oct;31(5):629-62.
5. Kim JG, Lim KS, Kim EK, Choi YM, Lee JY. Association of vitamin D receptor and estrogen receptor gene polymorphisms with bone mass in postmenopausal Korean women. Menopause 2001 May-Jun;8(3):222-8.
6. 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 Mar;186(3):345-50.
7. Kim JG, Kwon JH, Kim SH, Choi YM, Moon SY, Lee JY. Association between vitamin D receptor gene haplotypes and bone mass in postmenopausal Korean women. Am J Obstet Gynecol 2003 Nov;189(5):1234-40.
8. Kim JG, Kim JH, Kim JY, Ku SY, Jee BC, Suh CS, et al. Association between osteoprotegerin (OPG), receptor activator of

nuclear factor-kappaB (RANK), and RANK ligand (RANKL) gene polymorphisms and circulating OPG, soluble RANKL levels, and bone mineral density in Korean postmenopausal women. *Menopause* 2007 Sep-Oct;14(5):913-8.

9. Kim H, Chun S, Ku SY, Suh CS, Choi YM, Kim JG. Association between polymorphisms in tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor genes and circulating TNF, soluble TNF receptor levels, and bone mineral density in postmenopausal Korean women. *Menopause* 2009 Sep-Oct;16(5):1014-20.

10. Baron R, Rawadi G, Roman-Roman S. Wnt signaling: a key regulator of bone mass. *Curr Top Dev Biol* 2006;76:103-27.

11. Westendorf JJ, Kahler RA, Schroeder TM. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene* 2004 Oct;341:19-39.

12. Boland GM, Perkins G, Hall DJ, Tuan RS. Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2004 Dec;93(6):1210-30.

13. Etheridge SL, Spencer GJ, Heath DJ, Genever PG. Expression profiling and functional analysis of Wnt signaling mechanisms in mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2004;22(5):849-60.

14. Rawadi G, Vayssiere B, Dunn F, Baron R, Roman-Roman S. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res* 2003 Oct;18(10):1842-53.

15. Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, et al. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem* 2005 Sep;280(39):33132-40.

16. Tuli R, Tuli S, Nandi S, Huang X, Manner PA, Hozack WJ, et al. Transforming growth factor-beta-mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk. *J Biol Chem* 2003 Oct;278(42):41227-36.
17. Kulkarni NH, Halladay DL, Miles RR, Gilbert LM, Frolik CA, Galvin JR, et al. Effects of parathyroid hormone on Wnt signaling pathway in bone. *J Cell Biochem* 2005 Aug;95(6):1178-90.
18. Haegeler L, Ingold B, Naumann H, Tabatabai G, Ledermann B, Brandner S. Wnt signaling inhibits neural differentiation of embryonic stem cells by controlling bone morphogenetic protein expression. *Mol Cell Neurosci* 2003 Nov;24(3):696-708.
19. Baron R, Rawadi G. Wnt signaling and the regulation of bone mass. *Curr Osteoporos Rep* 2007 Jun;5(2):73-80.
20. Chen Y, Whetstone HC, Youn A, Nadesan P, Chow EC, Lin AC, et al. Beta-catenin signaling pathway is crucial for bone morphogenetic protein 2 to induce new bone formation. *J Biol Chem* 2007 Jan;282(1):526-33.
21. Knobloch J, Shaughnessy JD Jr, Ruther U. Thalidomide induces limb deformities by perturbing the Bmp/Dkk1/Wnt signaling pathway. *FASEB J* 2007 May;21(7):1410-21.
22. Cliens GA, Mohammad KS, Bao Y, Stephens OW, Suva LJ, Shaughnessy JD Jr, et al. Dickkopf homolog 1 mediates endothelin-1-stimulated new bone formation. *Mol Endocrinol* 2007 Feb;21(2):486-98.
23. Pinzone JJ, Hall BM, Thudi NK, Vonau M, Qiang YW, Rosoi TJ, et al. The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis,

- and disease. *Blood* 2009 Jan;113(3):517-25.
24. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med* 2007 Feb;13(2):156-63.
25. Li X, Liu P, Liu W, Maye P, Zhang J, Zhang Y, et al. Dkk2 has a role in terminal osteoblast differentiation and mineralized matrix formation. *Nat Genet* 2005 Sep;37(9):945-52.
26. Chan TF, Couchourel D, Elie A, Delalandre A, Duval N, Lajeunesse D. Elevated Dickkopf-2 levels contribute to the abnormal phenotype of human osteoarthritic osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2011 Jul;26(7):1399-410.
27. Aslan H, Ravid-Amir O, Clancy BM, Rezvankhah S, Pittman D, Pelled G, et al. Advanced molecular profiling in vivo detects novel function of dickkopf-3 in the regulation of bone formation. *J Bone Miner Res* 2006 Dec;21(2):1935-45.
28. Cho SW, Yang JY, Sun HJ, Jung JY, Her SJ, Cho HY, et al. Wnt inhibitory factor (WIF)-1 inhibits osteoblastic differentiation in mouse embryonic mesenchymal cells. *Bone* 2009 Jun;44(6):1069-77.
29. Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of Wnt signaling pathway. *J Cell Sci* 2003 Jul;116(Pt 13):2627-34.
30. Bovolenta P, Esteve P, Ruiz JM, Cisneros E, Lopez-Rios J. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci* 2008 Mar;121(Pt 6):737-46.
31. Bafico A, Gazit A, Pramila T, Finch PW, Yaniv A, Aarason SA. Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for RFP

- inhibition of Wnt signaling. *J Biol Chem* 2000 Jun;274(23):16180-7.
32. Lee HX, Ambrosio AL, Reversade B, De Robertis EM. Embryonic dorsal-ventral signaling: secreted frizzled-related proteins as inhibitors of tolloid proteinases. *Cee* 2006 Jan;124(1):147-59.
33. Hausler KD, Horwood NJ, Chuman Y, Fisher JL, Ellis J, Martin TJ, et al. Secreted frizzled-related protein-1 inhibits RANKL-dependent osteoclast formation. *J Bone Miner Res* 2004 Nov;19(11):1873-81.
34. Uren A, Reichsman F, Anest V, Taylor WG, Muraiso K, Bottaro DP, et al. Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to Wingless and is a biphasic modulator of Wnt signaling. *J Biol Chem* 2000 Feb;275(6):4374-82.
35. Bodline PV, Billiard J, Moran RA, Ponce-de-Leon H, McLamey S, Mangine A, et al. The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 controls osteoblast and osteocyte apoptosis. *J Cell Biochem* 2005 Dec;96(6):1212-30.
36. Bodine PV, Zhao W, Kharode YP, Bex FJ, Lambert AJ, Goad MB, et al. The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 is a negative regulator of trabecular bone formation in adult mice. *Mol Endocrinol* 2004 Mar;18(5):1222-37.
37. Wang FS, Lin CL, Chen YJ, Wang CJ, Yang KD, Huang YT, et al. Secreted frizzled-related protein 1 modulates glucocorticoid attenuation of osteogenic activities and bone loss. *Endocrinology* 2005 Mar;146(5):2415-23.
38. Yao W, Cheng Z, Shahnazari M, Dai W, Johnson ML Lane NE. Overexpression of secreted frizzled-related protein 1 inhibits bone formation and attenuates parathyroid hormone bone anabolic

- effects. *J Bone Miner Res* 2010 Feb;25(2):190-9.
39. Gaur T, Wixted JJ, Hussain S, O'Connell SL, Morgan EF, Ayers DC, et al. Secreted frizzled related protein 1 is a target to improved fracture healing. *J Cell Physiol* 2009 Jul;220(1):174-81.
40. Hayashi K, Yamaguchi T, Yano S, Kanazawa I, Yamauchi M, Yamamoto M, et al. BMP/Wnt antagonists are upregulated by dexamethasone in osteoblasts and reversed by alendronate and PTH: potential therapeutic targets for glucocorticoid-induced osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2009 Feb;379(2):261-6.
41. Bodine PV, Seestaller-Wehr L, Kharode YP, Bex FJ, Komm BS. Bone anabolic effects of parathyroid hormone are blunted by deletion of the Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1. *J Cell Physiol* 2007 Feb;210(2):352-7.
42. Taipaleenmaki H, Abdallah BM, AlDahmash A, Saamanen AM, Kassem M. Wnt signaling mediates the cross-talk between bone marrow derived pre-adipocytic and pre-osteoblastic cell populations. *Exp Cell Res* 2011 Apr;317(6):745-56.
43. Yoshino K, Rubin JS, Higinbotham KG, Uren A, Anest V, Plisov SY, et al. Secreted Frizzled-related proteins can regulate metanephric development. *Mech Dev* 2001 Apr;102(1-2):45-55.
44. von Marschall Z, Fisher LW. Secreted frizzled-related protein-2 (sFRP2) augments canonical Wnt3a-induced signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2010 Sep;400(3):299-304.
45. Sathi GA, Inoue M, Harada H, Rodriguez AP, Tamamura R, Tsujigiwa H, et al. Secreted frizzled related protein (sFRP)-2 inhibits bone formation and promotes cell proliferation in ameloblastoma. *Oral Oncol* 2009 Oct;45(10):856-60.

46. Esteve P, Bovolenta P. The advantages and disadvantages of sfrp1 and sfrp2 expression in pathological events. *Tohoku J Exp Med* 2010;221(1):11-7.
47. Chung YS, Baylink DJ, Srivastava AK, Amaar Y, Tapia B, Kasukawa Y, et al. Effects of secreted frizzled-related protein 3 on osteoblast in vitro. *J Bone Miner Res* 2004 Sep;19(9):1395-402.
48. Habra MA, Jimenez C, Huang SC, Cote GJ, Murphy WA Jr, Gagel RF, et al. Expression analysis of fibroblast growth factor-23, matrix extracellular phosphoglycoprotein, secreted frizzled-related protein-4, and fibroblast growth factor-7: identification of fibroblast growth factor-23 and matrix extracellular phosphoglycoprotein as major factors involved in tumor-induced osteomalacia. *Endocr Pract* 2008 Dec;14(9):1108-14.
49. Cho HY, Choi HJ, Sun HJ, Yang JY, An JH, Cho SW, et al. Transgenic mice overexpressing secreted frizzled-related proteins (sFRP4) under the control of serum amyloid P promoter exhibit low bone mass but did not result in disturbed phosphate homeostasis. *Bone* 2010 Aug;47(2):263-71.
50. James IE, Kumar S, Barnes MR, Gress CJ, Hand AT, Dodds RA, et al. FrzB-2: a human secreted frizzled-related protein with a potential role in chondrocyte apoptosis. *Osteoarthritis Cartilage* 2000 Nov;8(6):452-63.
51. Nakanishi R, Shimizu M, Mori M, Akiyama H, Okudaira S, Otsuki B, et al. Secreted frizzled-related protein 4 is a negative regulator of peak BMD in SAMP6 mice. *J Bone Miner Res* 2006 Nov;21(11):1713-21.
52. Park JR, Jung JW, Lee YS, Kang KS. The roles of Wnt

antagonists Dkk1 and sFRP4 during adipogenesis of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Cell Prolif* 2008 Dec;41(6):859-74.

53. Cho SW, Her SJ, Sun HJ, Choi OK, Yang JY, Kim SY, et al. Differential effects of secreted frizzled-related proteins (sFRPs) on osteoblastic differentiation of mouse mesenchymal cells and apoptosis of osteoblast. *Biochem Biophys Res Commun* 2008 Mar;367(2):399-405.

54. Li Y, Rankin SA, Sinner D, Kenny AP, Krieger PA, Zom AM. Sfrp5 coordinates foregut specification and morphogenesis by antagonizing both canonical and noncanonical Wnt11 signaling. *Genes Dev* 2008 Nov;22(21):3050-63.

55. Ouchi N, Higuchi A, Ohashi K, Oshima Y, Gokce N, Shibata R, et al. Sfrp5 is an anti-inflammatory adipokine that modulates metabolic dysfunction in obesity. *Science* 2010 Jul;329(5990):454-7.

56. Leaf I, Tennessen J, Mukhopadhyay M, Westphal H, Shawlot W. sFRP5 is not essential for axis formation in the mouse. *Genesis* 2006 Dec;44(12):573-8.

57. Gao G, Zhang ZL, He JW, Zhang H, Yue H, Hu WW, et al. No association of the polymorphisms of the frizzled-related protein gene with peak bone mineral density in Chinese nuclear families. *BMC Med Genet* 2010 Jan;11:1.

58. Lee DY, Kim H, Ku SY, Kim SH, Choi YM, Kim JG. Association between polymorphisms in Wnt signaling pathway genes and bone mineral density in postmenopausal Korean women. *Menopause* 2010 Sep-Oct;17(5):1064-70.

59. Lories RJ, Boonen S, Peeters J, de Vlam K, Luyten FP.

Evidence for a differential association of the Arg200Trp single-nucleotide polymorphism in FRZB with hip osteoarthritis and osteoporosis. *Rheumatology(Oxford)* 2006 Jan;45(1):113-4.

60. Ohnaka K, Yamamoto K, Nakamura K, Adachi M, Kawate H, Kono S, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in secreted frizzled-related protein 1 gene with bone mineral density in Japanese women. *Geriatr Gerontol Int* 2009 Sep;9(3):304-9.

61. Piters E, Balemans W, Nielsen TL, Andersen M, Boudin E, Brixen K, et al. Common genetic variation in the DKK1 gene is associated with hip axis length but not with bone mineral density and bone turnover markers in young adult men: results from the Odense Androgen Study. *Calcif Tissue Int* 2010 Apr;86(4):271-81.

62. Sims AM, Shephard N, Carter K, Doan T, Dowling A, Duncan EL, et al. Genetic analyses in a sample of individuals with high or low BMD shows association with multiple Wnt pathway genes. *J Bone Miner Res* 2008 Apr;23(4):499-506.

63. Valero C, Zarrabeitia MT, Hernandez JL, Pineda B, Cano A, Garcia-Perez MA, et al. Relationship of sclerostin and secreted frizzled protein polymorphisms with bone mineral density: an association study with replication in postmenopausal women. *Menopause* 2011 Jul;18(7):802-7.

64. Glass DA, 2nd, Karsenty G. Canonical Wnt signaling in osteoblasts is required for osteoclast differentiation. *Ann NY Acad Sci* 2006 Apr;1068:117-30.

65. Spencer GJ, Utting JC, Etheridge SL, Arnett TR, Genever PG. Wnt signalling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NFkappaB ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro.

- J Cell Sci 2006 Apr;119(Pt 7):1283-96.
66. Evangelou E, Chapman K, Meulenbelt I, Karassa FB, Loughlin J, Carr A, et al. Large-scale analysis of association between GDF5 and FRZB variants and osteoarthritis of the hip, knee, and hand. *Arthritis Rheum.* 2009 Jun;60(6):1710-21.
67. Rodriguez-Lopez J, Pombo-Suarez M, Liz M, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A. Further evidence of the role of frizzled-related protein gene polymorphisms in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2007 Aug;66(8):1052-5.
68. Loughlin J, Dowling B, Chapman K, Marcelline L, Mustafa Z, Southam L, et al. Functional variants within the secreted frizzled-related protein 3 gene are associated with hip osteoarthritis in females. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jun;101(26):9757-62.
69. Hirata H, Hinoda Y, Nakajima K, Kikuno N, Yamamura S, Kawakami K, et al. Wnt antagonist gene polymorphisms and renal cancer. *Cancer* 2009 Oct;115(19):4488-503.
70. Boudin E, Piters E, Nielsen TL, Anderson M, Roef G, Taes Y, et al. Single nucleotide polymorphisms in sFRP4 are associated with bone and body composition related parameters in Danish but not in Belgian men. *Mol Genet Metab* 2012 Jul;106(3):366-74.
71. Cho YS, Go MJ, Kim YJ, Heo JY, Oh JH, Ban HJ, et al. A large-scale genome-wide association study of Asian populations uncovers genetic factors influencing eight quantitative traits. *Nat Genet* 2009 May;41(5):527-34.
72. Berndt T, Craiq TA, Bowe AE, Vassiliadis J, Reczek D, Finnegan R, et al. Secreted frizzled-related protein 4 is a potent tumor-derived phosphaturic agent. *J Clin Invest* 2003

Sep;112(5):785-94.

73. Christov M, Koren S, Yuan Q, Baron R, Lanske B. Genetic ablation of *Sfrp4* in mice does not affect serum phosphate homeostasis. *Endocrinology* 2011 May;152(5):2031-6.

74. Nakanishi R, Akiyama H, Kimura H, Otsuki B, Shimizu M, Tsuboyama T, et al. Osteoblast-targeted expression of *sfrp4* in mice results in low bone mass. *J Bone Miner Res* 2008 Feb;23(2):271-7.

75. Okada Y, Sakaue H, Nagare T, Kasuga M. Diet-induced up-regulation of gene expression in adipocytes without changes in DNA methylation. *Kobe J Med Sci* 2009 Mar;54(2):E241-9.

76. Kerkhof JM, Uitterlinden AG, Valdes AM, Hart DJ, Rivadeneira F, Jhamai M, et al. Radiographic osteoarthritis at three joint sites and *FRZB*, *LRP5*, and *LRP6* polymorphisms in two population-based cohorts. *Osteoarthritis Cartilage* 2008 Oct;16(10):1141-9.

77. Tranah GJ, Taylor BC, Lui LY, Zmuda JM, Cauley JA, Ensrud KE, et al. Genetic variation in candidate osteoporosis genes, bone mineral density, and fracture risk: the study of osteoporotic fractures. *Calcif Tissue Int.* 2008 Sep;83(3):155-66.

78. Gordon A, Southam L, Loughlin J, Wilson AG, Stockley I, Hamer AJ, et al. Variantion in the secreted frizzled-related protein-3 gene and risk of osteolysis and heterotopic ossification after total hip arthroplasty. *J Orthop Res* 2007 Dec;25(12):1665-70.

Abstract

Introduction: The purposes of this study were to investigate the relationship between the polymorphisms in Wnt antagonists genes, and BMD in postmenopausal Korean women, and to test the hypothesis that these polymorphisms in Wnt antagonist genes are associated with serum levels of osteoprotegerin (OPG), soluble receptor activator of NF- κ B ligand (sRANKL) and bone turnover markers, etc.

Methods: Nineteen single nucleotide polymorphism (SNP)s in Wnt antagonists genes were analyzed by restriction fragment length polymorphism, Taqman assay, and direct DNA sequencing in 399 postmenopausal Korean women. Serum levels of OPG and sRANKL bone turnover markers were measured. The bone mineral density (BMD) at the lumbar spine and proximal femur was determined by dual energy X-ray absorptiometry.

Results: The c.28G>A, and c.496C>A SNP in Wnt inhibitory factor (WIF)-1 gene, c.-38C>G, and c.134C>G SNP in secreted frizzled-related-protein (SFRP)2 gene, c.598C>T SNP in SFRP3 gene, c.34A>T, and c.35C>A SNP in SFRP5 gene, and c.92C>A, c.147G>A, and c.706G>A SNP in Dickkopf (Dkk)3 gene were not observed. Significant association between the haplotype genotype defined by combination of c.958C>A, and c.1019G>A SNPs in SFRP4 gene and BMD at the lumbar spine were observed. After adjusting for potential confounding factors such as age, body mass index, and menopause duration, the BMD in the haplotype genotype AA homozygotes was

lower than in corresponding genotypes respectively. The haplotype genotype AA homozygote was 4.37 times more frequently found in women with osteoporosis at the lumbar spine. No associations were noted between BMD at skeletal sites measured and other SNPs in Wnt antagonist genes. After adjusting for age, years since menopause and body mass index, serum bone alkaline phosphatase levels in the haplotype AA homozygotes ($P < 0.001$) showed the highest levels. No significant differences in the adjusted serum levels of osteocalcin, parathyroid hormone, calcium according to genotypes of single other SNPs in Wnt antagonist genes and haplotype genotypes of SFRP4 SNPs were noted. Adjusted serum levels of OPG, sRANKL, and their ratio were not different according to genotypes of single SNPs in Wnt antagonists genes and haplotype genotypes of SFRP4 SNPs whereas RANKL/OPG ratios in SFRP1 haplotype genotypes without CC were significantly higher than those in other haplotype genotypes.

Conclusions: These data indicate that haplotype genotype composed of the c.958G>A, and c.1019 G>A SNP in SFRP4 gene among Wnt antagonist genes is one of the genetic factors affecting bone mineral density at the lumbar spine and the measurement of these polymorphisms may be useful in identifying Korean women at the risk of osteoporosis.

Keywords: postmenopausal Korean women, Wnt antagonists, gene polymorphism, bone mass

Student Number: 2009-31085