

國立清華大學生命科學系

博士論文

尿路結石的生物礦化機制探索

Mechanisms of Biomineralization and

Genetics in Urolithiasis

學號姓名：868211 陳汶吉 (Wen-Chi Chen)

指導教授：李 家 維 (Chia-Wei Li) 教 授

中華民國九十年二月

Abstract

Urolithiasis is a complex genetic traits disease that the formation is regarded as a process of biomineralization. The exact mechanism of the stone formation is still unclear. However, biomolecules are proposed to play a role in the biomineralization. In this study, we aimed to investigate the mechanism of stone formation through biochemistry and molecular genetics.

Effects of nephrocalcin, Tamm-Horsfall protein, and albumin on calcium oxalate crystallization were tested through crystal nucleation, crystal growth, and crystal aggregation which were determined by spectrophotometry. Albumin and Tamm-Horsfall proteins exerted a promoting effect of nucleation in this study. Inhibitory effects of these proteins on crystal growth and crystal aggregation were found in this study. Nephrocalcin showed an inhibitory effect on the crystal growth but lost its effect when nephrocalcin was fragmented into two short peptides by the interaction with added ascorbic acid and copper ions in the solution.

Being able to promote the nucleation of calcium oxalate crystal and then reduce the concentration of calcium and oxalate ions, Tamm-Horsfall protein and albumin showed an overall effect of inhibition in the calcium oxalate crystallization. Nephrocalcin is also an inhibitor in the crystallization of calcium oxalate. The influence of ascorbic acid and copper ions in calcium oxalate stone formation should be further studied clinically.

Genetic polymorphisms were used in the identification of associated genes with complex disease. To our knowledge, fewer studies were done on the urolithiasis. Case-control studies comparing the allele frequencies of candidate genes between affected individuals and unaffected individuals were performed. Vitamin D receptor gene (start codon and intron 8), calcitonin receptor gene (the 1377th nucleotide), p21 gene (codon 31), osteocalcin gene, interleukin 1 gene (start codon and intron 5),

interleukin 1 receptor antagonist gene (intron 2), androgen receptor gene (CAG repeats), and estrogen receptor gene (TA repeats) polymorphisms were tested for the association with urolithiasis.

Polymerase chain reaction based restriction analyses were used for the association study. The results indicated that vitamin D receptor gene, calcitonin receptor gene, p21 gene, interleukin 1 receptor antagonist gene, and androgen receptor gene (only for male patients) polymorphisms are associated with urolithiasis. The odds ratios for the risk of disease were 1.672, 5.634, 1.39, 6.041, and 0.328 (for low risk), respectively. No statistically significant difference were found in vitamin D receptor gene intron 8, osteocalcin, interleukin 1 gene start codon and intron 5, and androgen receptor gene (for female patients) polymorphisms.

Although positive association does not necessarily imply carrying the genes will develop clinical disease, it worth to be further studied for the interaction of genes and some risk factors. Documenting gene-environmental interactions may identify groups at highest risk for the stone formation. In conclusion, it is helpful to understand the candidate genes through studies of genetic polymorphisms. Studies effects of proteins on crystallizations are also helpful to understand the inhibitor roles of nephrocalcin, Tamm-Horsfall protein and albumin. The approach through biochemistry and molecular genetics can get further information on the biomineralized processes of urolithiasis.

中文摘要

尿路結石是複雜和遺傳的疾病，其形成的過程被稱為生物礦化，真正的機轉雖然尚未清楚，但是生物分子可能參與其中，我們研究的目標是以生化學和分子遺傳學的方法來探討尿路結石形成的機制。

腎調鈣素、Tamm-Horsfall 蛋白和白蛋白對草算鈣結晶形成的作用是以成核、晶體成長和晶體聚集的步驟分別測試的，Tamm-Horsfall 蛋白和白蛋白對晶體成核是以促進的作用，二者在晶體成長和聚集均呈抑制作用，腎調鈣素能抑制晶體成長，但在加入維生素 C 和銅離子作用後斷成兩個胜 而失去作用。

由於促進成核會使後續晶體成長和聚集所需的濃度減少因此無法形成大的晶體，所以 Tamm-Horsfall 蛋白和白蛋白對草酸鈣晶體的整體作用是抑制因子，腎調鈣素也是抑制因子，維生素 C 和銅離子對草酸鈣晶體的作用需要進一步臨床上的研究來驗證。

核酸多形性是用來尋找複雜疾病關聯基因的方法，但是目前很少有此類相關的研究，我們以病例-控制的方法來比較正常人和結石病人基因上標記位置對偶基因出現的頻率。維生素 D 受體基因開始碼和第八插入序列、降血鈣素受體、p21 基因、破骨素基因、白血球介素 1 基因開始碼和第五插入序列、白血球介素 1 受體拮抗基因第二插入序列雄性素受體基因和雌性素受體基因等多形性是選用測試與尿路結石關聯性的基因。

以聚合 鏈鎖反應為基礎的限制 分析法是用來檢測的方法，結果顯示，維生素 D 受體基因開始碼、降血鈣素受體、p21 基因、白血球介素 1 受體拮抗基因第二插入序列和雄性素受體基因（只限男性病人）等多形性與尿路結石有相關聯，其風險對比值分別為 1.672, 5.634, 1.39, 6.041,和 0.328（男病患低風險值）；而維生素 D 受體基因第八插入序列、破骨素基因、白血球介素 1 基因開始碼和第五插入序列、雄性素受體基因和雌性素受體基因（女性病患）則無統計學上的差異。

雖然正相關並不代表此基因一定會在臨床上造成疾病，但是它可以運用於

與危險因子交互作用的探討，計量基因與環境因子的交互作用可以算出那些因子可能有結石的高危險性，以達到預防的目的。本研究可以幫助我們了解那些基因適合作為與結石病的關聯性探討，也了解腎調鈣素、Tamm-Horsfall 蛋白和白蛋白是草酸鈣晶體形成的抑制因子，因此以生化學和分子遺傳學的方法可以協助研究尿路結石的生物礦化過程。

謝辭

感謝在我人生道路上幫助我的所有眾生，沒有你們就沒有我。

本文能夠完成要感謝張立奇、林和昇、石清華、陳慧毅同學在實驗上給予的協助。

感謝許正德、吳玫珍在實驗室中的諸多協助。

感謝李家維教授的殷切指導論文、蔡輔仁副教授實驗室上的諸多協助。

感謝父母、內人麗華及三位兒女的精神鼓勵和支持。

感恩。

目 錄

第一章 緒言

第一節 結石的流行病學	1
第二節 尿路結石的臨床表徵	2
第三節 生物礦化	2
第四節 生物系統內的草酸鈣	3
第五節 草酸鈣結晶形成的物理化學基礎	4
第六節 結晶調節因子 (crystal modifiers)	6
第七節 結晶晶體的留存	7
第八節 自由基在結石形成中所扮演的角色	7
第九節 小結	8

第二章、文獻回顧

第一節 抑制因子學說	9
第二節 Nephrocalcin 的文獻回顧	9
第三節 Tamm-Horsfall 蛋白的文獻回顧	10
第四節 人類血清白蛋白的文獻回顧	11
第五節 晶體-細胞間的交互作用	11
第六節 以基因多形性來探索複雜性疾病的文獻回顧	12
第七節 選用的基因	13
第八節 小結	17

第三章 材料與方法

第一節、 概述	18
第二節、 儀器設備	18
第三節、 實驗試劑	18
第四節、 尿液收集與濃縮方法	18
第五節、 蛋白質的液相層析	19
甲、 腎調鈣素	19
乙、 Tamm-Horsfall 蛋白的純化	20
丙、 血清白蛋白的純化	20
丁、 酵素移除唾液酸的實驗	20
第六節、 蛋白質之電泳、染色與定量	21
第七節、 結晶三大步驟的實驗方法	21
甲、 製備草酸鈣晶種	22
乙、 結晶成核的抑制作用	22
丙、 結晶成長的抑制實驗	22
丁、 結晶聚集的抑制實驗測定	23
第八節、 自由基的反應實驗 (Xanthine oxidase inhibition assay)	23
第九節、 結石病患與正常人 DNA 的收集	24

第十節、聚合 鏈反應 (Polymerase chain reaction, PCR)	24
第十一節、核酸之電泳、限制 反應與照相	26
第十二節、電腦資料的處理	27
第四章、結果	28
第五章、討論	34
第六章、結論	42
第七章、表格	43
第八章、參考文獻	52
附錄一、圖	68
附錄二、個人經歷	75
附錄三、已發表之論文	

尿路結石的生物礦化機制與遺傳學探索

第二章 緒言

第一節 結石的流行病學

尿路結石是自古已來就困擾人類的一種疾病，最早的具體證據是古埃及的木乃伊身上的腎與膀胱結石[139]，直到現在此病並沒有因為文明的發展而減少，反而有漸漸增加的趨勢。在科學昌明的時代它仍然是一個重大的疾病，每年約有2%至3%的盛行率，發生率約在男性為10%，女性為5% [139]，好發於三十歲至五十歲這個年齡層，但是這幾年內年齡有逐漸下降的趨勢[12]。如果沒有積極的預防和治療其第一年的復發率為10%，五年為35%，十年則超過50%[139]，在台灣，也有10%的發生率[154]。

尿路結石是一個多因子的疾病，舉凡遺傳、感染、氣候、飲食、地理環境和種族因素都曾經被提出與其相關性，甚至是異物移入也可能是致病的因素[87]。在種族方面的研究發現，美洲原住民、黑人及以色列人都是相對發生率比較低的民族，而相對之下居住於比較低溫環境的亞洲人和白種人則是發生率比較高的族群，飲食習慣的改變只是更改了結石發生部位而已，對於發生率則沒有影響[133]。因此種族在基因方面的差異影響結石發生或許值得進一步探討。在性別方面，不同的原因可能是雄性激素影響結石的形成 [78,141]，或由於女性有較高的抑制因子濃度的差異造成 [151]，這些仍有待進一步從分子生物學的方向去研究。

結石是多晶體的聚合物，含有大量的晶體和有機質，尿路結石最常見的成分是草酸鈣，約佔了乾重的百分之八十[12]，這比例也比過去報告的百分之七十有所增加。很多造成結石的代謝疾病是遺傳性的，由 Resnick 和 McGeown 等人的遺傳學研究發現，尿路結石是多基因的缺陷而部分表現的疾病[24,95,117]，如家族性遺傳腎小管酸中毒會合併腎結石或腎鈣化達70%以上[36]，胱胺酸結石症是一個同源隱性遺傳的先天性代謝疾病，黃嘌呤結石症也是一個遺傳的疾病，原發性

高草酸尿症所造成的結石是 AGT 基因突變所造成的隱性遺傳病，但是上述相關疾病其發生率太低，可能只是人口的十萬分之一而已[146]。在人類尿路結石的病人中，病因不明的高尿鈣症才是最常見的異常現象[12]，而草酸鈣結晶的含鈣結石也佔最多，所以要找可能的致病因子，可能要從能影響鈣鹽的代謝及排泄的因子開始。

第二節、尿路結石的臨床表徵

如果結石阻塞在尿路系統內就會使病人感受到有急性的絞痛，可能的位置有腎輸尿管交接處、輸尿管橫越動脈的地方和輸尿管膀胱交接處。典型的結石絞痛通常半夜或清晨發生，使得病人坐立難安，痛由後腰肋椎交角開始，沿側腹部向下腹部延伸，腰部無法伸直，伴隨有臉色蒼白、盜汗、嘔吐或睪丸疼痛；女性則有陰唇部位的疼痛，有時病人肉眼可發現血尿，偶而病人會有發燒的現象[16, 144]。上述症狀實際上只發生於一半的病人，其餘的一半病人症狀並不明顯，若不積極處理，有些病人會有阻塞性腎病變，甚至腎衰竭而須行血液透析治療。由於有一半病人在五年內結石會復發，所以醫師會建議病人接受代謝評估，潛在的病因有高尿鈣症、高草酸尿症、高尿酸尿症及低枸橼酸尿症(hypocitrauria)等[111]，雖然有這樣的分類，但是臨床上除了碎石及手術治療有較大的進展外，其內科治療和預防工作除枸橼酸鉀口服治療外並無很大的突破[14]，歸咎其原因可能是目前的病因尚不很清楚，而且大部分的結石病人是屬於病因不明的族群[15]，因此結石病因的探討仍然需要加緊努力。

第三節、生物礦化

生物處理難溶於水易成晶的礦物質，會以過飽和的狀態存於體液當中，因此被生物體攝入的離子，對生物體有害的如草酸鈣，必須集中儲存[66]；如是身體結構所必須，像骨骼或牙齒，則沉積於體內建造了龐大身軀所必要的支柱。這些把游離的離子轉成礦物的過程，稱之為生物礦化(biomineralization)。生物礦化所包含的礦物質如磷灰石、方解石等，從組成上看，與自然界岩石相同，但是當它們結合在生物體內的硬組織中時，就表現出特別的生理性質和生理功能，這是因

為生物礦物是在特定的生物條件下形成的，從而具有特別的高級結構與組裝方式。這個過程需要在體液中創造出合適的物理化學環境以利礦化的進行[90]，所形成的生物礦物體是生物的有機化合物與環境的無機礦物離子相互作用所產生的複合物，因此生物礦化必須有生物體參與，生物體以高度複雜的機制，使生物礦化以設定和限制的方式進行。

生物礦化普遍存在於生物界，無論動物、植物、真菌或細菌均可見[66]，可分成生物誘導礦化作用與生物控制礦化作用。生物誘導礦化大部分發生在生物與環境之間；而生物控制礦化則侷限在某個體積內，有體內胞內型、體內胞外型 and 體外胞外型[125]。生物控制形成的生物礦體含有機物質量較高，具各種氨基酸組成，常有蛋白質參與[5,88]。雖然目前我們對於其中蛋白質真正作用尚有許多不明之處，但根據推論，蛋白質可以是礦物中的超級結構分子、沉積過程處理蛋白質或是控制界面能量的蛋白質[86]。透過蛋白質的種種研究，這些角色必定有解開其謎團的一天。人類的尿路結石因為在尿液內形成，是體內的一部份，與生物礦化的過程息息相關，蛋白質的研究是尿路結石的學問中重要的一支。

第四節、生物系統內的草酸鈣

在自然界中幾乎所有的生物體內中都有草酸鈣(calcium oxalate)的存在。在植物中大部份的種子植物家族均有草酸鈣的沉積，此種亮晶晶的物質有各種不同的作用，有的是儲存過多的鈣、有的構成外骨骼或使牛馬咀嚼起來較不可口而放棄食入[66]。在人類和其他哺乳動物草酸鈣則主要是內源性產生和食物攝入[66]，由於無法代謝成其他物質，所以草酸鈣會從尿液排泄，尿液中如果分泌過多則可能沉積在腎臟形成晶體，最後造成腎衰竭。牛隻吃入含有大量草酸的藜科植物，會因而長腎結石及引起腎衰竭，使得牛群大量死亡。在台灣的結石病人中，草酸鈣結石佔了百分之八十的比例[12,55]，因此草酸鈣對生物和人類都會引起重大疾病。

在過去十五至二十年間對於草酸鈣結石的研究相當的多，相較下對於草酸根的研究卻分散於植物學，生物化學，細胞及分子生物學，物理生物化學，微生物

學，泌尿科學以及腎臟學等學門，因此對於草酸根在人體的代謝合成和分泌了解就比較少。多數研究均注重在鈣，又加上草酸根的成份研究成本過高，且操作繁複，所以目前草酸根的臨床研究是相當少的，但是草酸根究竟是否對於結石的形成較不相干，有待更多的研究來證明。

第五節、草酸鈣結晶形成的物理化學基礎

草酸鈣晶體的形成是溶液中過飽和之後晶體析出的一連串過程，這個過程可以純物理化學的理論加以分析。雖然人體內的生化途徑是相當複雜的，但任何礦化的現象仍須符合熱力學的理論，含有兩種主要的物理化學現象：一是熱力學的過飽和現象造成微晶體核心形成，另一個是動態的晶體成核、生長、聚集和相態轉形速率，也就是說有賴於溶液中的過飽和現象[2,68]。這四個步驟決定晶體形成時的相態、形狀、大小和數目，以下為晶體成形時的重要物理化學原則：

過飽和 (oversaturation)

過飽和代表過多的自由能，亦即結晶形成所必須的熱力學的驅動力

(thermodynamic driving force), 如果用 ΔG 表示自由能，則過飽和的公式可以是

$$\Delta G = RT \ln(A_i/A_0),$$

R 是空氣常數，T 指溫度， A_i 或 A_0 代表非游離鹽在溶液中的活動產物， A_i 是指任何狀態， A_0 則是指平衡狀態時的活性， A_i/A_0 的比例是指相對的過飽和比，在相對飽和度 (relative saturation, RS) 超過 1 時，溶液的狀態是過飽和的，結晶形成顆粒的速度大於解離的速度，晶體形成才能開始，所以過飽和無疑是尿路結石的關鍵因素。但是人類尿液中的草酸根離子和鈣離子濃度比常是過飽和的，卻也不一定能形成尿路結石，所以過飽和本身是不能完全解釋尿路結石形成的原因。

結晶成核 (nucleation)

為了排除過多的自由能，過飽和溶液會把過多的鹽沉積成固相以達成平衡的狀態，允許過飽和溶液中把液相轉成固相的初始動力學步驟叫做成核。這過程是從溶液中的結石鹽成分轉成鬆散的晶體聚

集開始的，如果加入新的成分或聚集物進入溶液中則此聚集會開始長大；起初，聚集物並不會形成高度有序的內部結構，但是一旦時間足夠，內部的溶液鍵就會被離子鍵所取代而形成規則的內部結構，聚集逐漸形成晶胚。也就是說聚集物的內部構造受溶液的條件的影響會愈來愈少，而慢慢變成規則的結晶晶格構造。通常，成核時由於聚合物要克服建立新介面所需的自由能梯度，有一個臨界核心需要克服，成核的活化能由臨界核心的表面能和系統內的過飽和程度來決定。

結晶成長 (crystal growth)

一旦晶核已長到臨界大小而且相對飽和保持高於一，繼續加入新的結晶成分會使總體自由能減少，此過程稱為晶體成長，其驅動力是形成新的晶格鍵合力與晶格本身或溶液中的結晶成分溶解所需能量，兩者之間的淨差值。最後使結晶物質嵌於晶格之上是一連串繁複的過程，如特定化(speciation)、質塊擴散(bulk diffusion)、介面形成(interface)及吸附(adsorption)等，單一聚合體最後到達嵌入晶格的晶面位置[69]。

單一聚合體附著於晶面之上以後，可以停留在其上、越過表面或因溶解而再度離開晶面。停在其上和越過表面能階上是相同的，只有第三者才有能量閾值，也就是說溶解這個過程需要較多的能量來打破離子與晶格間的作用力。由質塊擴散或晶體溶液間介面或兩者綜合來決定生長的速度，會因顆粒大小而有所不同，像草酸鈣這種難溶的鹽類介面的直徑大約在 $10\mu\text{m}$ ，而擴散直徑可超過 $100\mu\text{m}$ ，人類尿液中的草酸鈣晶體直徑都小於 $10\mu\text{m}$ [144]。因此晶體成長大部分是介面控制的，但是復發的結石患者常常分泌大的結晶顆粒，所以擴散與介面同等重要，擴散與介面作用是在不純的溶液中沉澱的，因此又稱為共同沉澱 (co-precipitated)。

晶體聚集 (crystal aggregation or agglomeration)

晶體在溶液中相互粘在一起而形成大的顆粒的過程稱為聚集，這個過程在能階上是易於進行的，而且是自然發生的。雖然聚集的速度可以受一個溶液的飽和

狀態所影響，聚集本身是可以在任何飽和狀態下發生的，亦即過飽和、飽和與未飽和狀態，聚集同時也是很快的步驟，可以在幾秒鐘內形成大的顆粒。離子擴散、表面反應、溫度和酸鹼值均會影響結晶的相變(phase transformation)，即聚集的反應。

在溶液中聚集成顆粒同時受到聚集及分開等基本力量所交互作用管制，當兩個顆粒間的距離非常接近時，凡德瓦力 (van der Waals) 大增，因此可以使顆粒容易聚集；聚集可以進一步被粘稠的蛋白質所增強，如 Tamm-Horsfall 蛋白的自我聚集，使晶體能如同漿糊般粘著，粘稠鍵合力的大小視所附著的生物巨分子的特質而定，它可以大到足以克服分離的晶體間的電位[53]。一旦聚集已經成形，它可以被固體橋接或沉澱橋接所穩定，也就是說兩個顆粒由結晶物質所連接，固體橋可以是陷在兩顆粒間的晶體或鄰近的兩個晶格重新排列所形成。

第六節、結晶調節因子 (crystal modifiers)

在腎小管的尿液中，結晶的形成有很大部分仰賴於溶液中的成分，尿液中的某些成份因為像螯合劑，所以會影響溶液的過飽和程度，例如枸橼酸和鎂離子與草酸鈣產生了易溶的複合物[137]，相對的降低了草酸根和鈣離子飽和的程度。這個效應不只降低了熱力學上的驅動力，也降低了結晶的動態力，任何可能阻礙結晶的物質，不管其潛在機轉是甚麼，皆被稱為抑制因子(inhibitor)。反之，不管是形成結石的離子或是其核心 (異質相的 heterogeneous)，凡是增加尿液草酸和鈣離子過飽和的物質均可稱為促進因子(promoter)。

如果將抑制因子和促進因子做較嚴謹的定義，在未飽和時，吸附的物質可以影響晶體表面的物理、化學和電子特性，因此影響了生長和聚集的速度。抑制因子阻斷了晶體表面生長位置降低了結晶的速率，而促進因子則提供了異質相的核心、晶體生長和聚集的異物表面且不改變飽和的狀態，加快了晶體生長的速度[16]。

由於某些分子在結晶過程和過飽和時有不同的影響力，這些調節因子(modifier)對晶體過飽和核心形成、晶體成長以及晶體聚集等過程或許有相反的

個別影響力，如枸橼酸與鈣形成複合物，狀如螯合劑降低了飽和度，並不利於結晶形成，而且枸橼酸在低濃度時降低結晶速度，同時它螯合了某些與蛋白質鍵合的鈣，可以影響 Tamm-Horsfall 蛋白的功能和結構，反使蛋白質促進了晶體的形成，所以它是草酸鈣晶體聚集的調節因子[137]。

第七節、結晶晶體的留存

結石形成的理論如果只用上述幾個步驟解釋是不夠的[16]。人類尿液中結晶的分子濃度常常是過飽和的，所以不管是正常人或結石病人的尿液中都經常出現結晶顆粒，況且尿液在腎小管內僅流動八分鐘[69]，所以上述理論實不足以完全解釋尿路結石形成的原因。如果晶體可以在腎臟內留存 (retention)，就有足夠的時間逐漸長成較大的顆粒，形成未來腎結石的病灶。理論上，留存的定義是顆粒的移動速度比尿流慢，使得顆粒變大無法自由穿過腎小管或者是它會粘著在腎小管表面，如果沒有留存，則草酸鈣在很小晶體時就會被尿液沖走。固定顆粒(fixed particle)學說中[34]，有下列幾種固定：腎蓋的糖基(glycocalyx)、細胞受傷後的細胞膜碎片以及糖蛋白的聚集等，這些現象在實驗動物和腎結石病人的腎切片中都可以發現，因此這個理論也廣泛被運用來做為實驗的依據，如自由基(free radicals)的傷害造成晶體留存的實驗[86]。

第八節、自由基在結石形成中所扮演的角色

自由基就是任何可以自由存在的分子，含有一個或多個未配對之電子[49]。一個分子或原子在其某個軌道上只有一個電子就是未配對電子，它們可以相互吸引成一個磁場使得其分子變得高度反應性[48]。其未配對的電子會去搶奪細胞內生物分子中之電子，如核酸、蛋白質、氨基酸、磷脂質、脂蛋白、醣類及結締組織等生物分子，產生不可逆的反應，使細胞受傷。因此自由基與很多疾病都息息相關，如老化及癌症等[49]。很多藥物的研發也針對自由基而進行，希望可以找到能對抗自由基的藥物，來治療疾病。自由基也會使腎細胞受傷，使結晶沉積在實驗動物內[136]。這些受傷細胞的剝落又可以促進結石的成核、吸附和結晶留存。

腎小管細胞內高密度的粒線體在急性腎衰竭時其結構和功能均出現異常，同時 xanthine 和 arachidonate 的代謝非常活躍，因此超氧自由基在腎缺血-回流的受傷狀態時扮演一個重要的角色。在實驗動物中以腎毒性藥物誘發腎炎時，從多形核白血球及腎絲球上的 mesangial 細胞衍生而來的自由基是產生腎絲球受傷的致病原因。糖氨類抗生素的腎毒性也是自由基所引起的[64,99]，所以自由基對腎細胞的傷害是明顯的。

自由基的產生是隨時隨地的，沒有一個人可以倖免的，既然是這樣，為什麼不是每個人都會因自由基的攻擊細胞而產生結石呢？因為人體內有很多的蛋白質可以對抗自由基，如超氧歧化 (superoxide dismutase, SOD)、金屬蛋白 (metallothioneine) 和 GST (glutathione) 等[49]，這些蛋白質透過氧化和還原的反應來清除自由基。所以人體內的蛋白質若有能力提供電子給予自由基，就有可能來對抗自由基的傷害，但是每個人清除自由基的能力會因這些蛋白質的量與質而有所差異[6]，因此自由基致病能力也有所不同。尿液中有很多蛋白質被提出來是抑制因子，這些蛋白質是否也可以防止自由基的產生，進而防止結石的產生；同時這蛋白質的質與量是否也有差異，使產生結石的機會也各有不同，是一個值得探討的現象。因此自由基的一些實驗方式也可用來探討尿液中蛋白質的作用，以增加對結石形成機制的認識。

第九節、小結

在進行草酸鈣結石生物礦化機制探索時，即依循上述理論來作為實驗上的基礎。也就是說結晶成核、生長和聚集是所必須採用的觀察方法，加自由基的細胞傷害模式，使晶體留存於腎細胞內，構成結石形成的整體理論架構。如果生物分子可以對結晶過程有所作用的話，應該能夠影響上述幾個步驟的進行。下一章我們將回顧一些文獻以探討可能對結石形成產生影響的因子。

第三章 文獻回顧

第一節、抑制因子學說

結石病人與正常人尿液中結石鹽飽和度並無明顯差異，這使人推測尿液中一定還存在著某些物質，能在尿路結石形成的熱動力學過程中產生作用，這就是尿路結石形成的抑制因子[12]。這些物質它能影響結石鹽在飽和的尿液中形成核心、生長或聚集，以及固相轉化等一系列結晶動力學過程[29]。正常人尿液中由於抑制因子的濃度或活力高，所以不易長結石，而病人尿中由於缺乏抑制因子，所以容易長結石。對草酸鈣結石礦化抑制劑主要是大分子，如葡萄糖氨聚糖 (Glycosaminoglycans, GAGS)、酸性多勝 與類 RNA 物質等。此外，還有人報告尿中氨基酸和微量元素對尿路結石的形成也有抑制作用[97]。蛋白質在生物礦化過程中扮演著某些角色，其中以抑制因子的研究報告為最多。所以探討抑制因子在尿液中的功用，是值得進一步進行的，希望將來可以運用於臨床治療或改善結石病人的尿液飽和狀態，做預防的工作。

第二節、Nephrocalcin 的文獻回顧

腎調鈣素(Nephrocalcin)是由 Nakagawa 等人(1981)所純化出來的[103]，Nephrocalcin 是由近端腎小管及亨利氏環(Henle's loop)的厚上升枝(thick ascending limb)所分泌的[99]。腎調鈣素分子量約 14,000，在單純溶液中是最有力的草酸鈣晶體成長抑制因子，富含 γ -carboxyglutamic acid (GLA) 酸基。從草酸鈣結石病人的尿中分離的腎調鈣素其抑制力是正常人的十分之一，且缺乏 γ -carboxyglutamic acid [105]。從 ^{31}P -NMR 光譜儀的研究結果顯示，一個腎調鈣素分子要結合四個鈣分子才會飽和[106]；從電子順磁共振上的金屬結合模式的研究發現，腎調鈣素四個同源蛋白之一，NC-A 是最具有抑制草酸鈣晶體成長能力的，而 NC-C 則是最弱的[102]。正常的腎調鈣素以 Lauda film balance 測量時發現它是具厭水及親水性的雙性蛋白質[104]，因此如果以親水端結合在晶體表面，然後使厭水端面向外，則可抑制晶體繼續成長[107]。但是其氨基酸序列仍尚未定出，Tang 等人認為它是 inter- α -trypsin inhibitor 分枝 bikunin 的尿中衍生

物[134]，由於原始純化方法比較繁複，因此其研究較少人繼續參與。Coe 等認為腎調鈣素是草酸鈣結晶和結石的抑制因子[17]。因為稀有金屬與蛋白質交互作用後會參與結晶成長的抑制作用[97]，因此我們設計了簡單的純化步驟並探討它與稀有金屬間的交互作用。

第三節、Tamm-Horsfall 蛋白的文獻回顧

Tamm-Horsfall Protein (THP)是最早被發現，也是尿液中含量最多的蛋白質，二十四小時約 20 到 200mg 的分泌量約為 250 nM 到 2.5 μ M [59]。THP 分子量約 78,000。THP 在厚上升枝及遠端腎小管內合成，不能抑制草酸鈣晶體成長但能抑制晶體聚集，THP 常常自我聚集，使其高濃度時產生相反的促進結晶聚集作用 [52,128]。但是，近年來，也有人認為 THP 是結石的成核因子[147]，此說是因為 THP 是一個中性蛋白質，它在酸性的尿液中可能會聚成一團而不溶，且 THP 又能吸附鈣離子，所以很容易成為結石生長的核心。Hallson 提出了 THP 在不同的濃度時會有不同的功能[50]，其在結石所扮演的角色是同時為結石的抑制因子也是促進因子，而這些說法都還未得到進一步的證實。

THP 有 616 個氨基酸，內含 48 個肱氨酸和 *N*-端連結糖基唾液酸[73]。唾液酸約佔全部的 5% 重量，唾液酸 (*N*-acetylneuraminic acid, or NANA) 是含有九個碳原子的酸性氨基糖(5-amino-3,5-dideoxy-D-glycero- Dgalacto- nonulosonic acid), 它是由鍵合在細胞膜上的唾液酸轉移 利用 cytidine monophosphate (CMP)-linked species 當受者轉換成糖蛋白或糖脂質[41]。如果改變 THP 上的醣基會影響 THP 的功能[54,101]，唾液酸去除後的 THP 對細胞激素如白血球介素-1、-2 和腫瘤壞死因子的結合能力會降低 [54,101]，也會使其對晶體成長和聚集的抑制作用降低，因此唾液酸對晶體形成可能有部分抑制作用[50]。Knorle 等人[67]曾報告 THP 上的唾液酸對結石的形成影響很大，唾液酸會粘在遠端腎元上的糖化腎盞可能使微晶粒附在上皮上[56]，因此唾液酸對於結石形成的影響可能存在。所以在本研究中也探討了去除唾液酸後的 THP 在結晶形成初期的幾個步驟中的作用。

第四節、人類血清白蛋白的文獻回顧

人類血清白蛋白(Human serum albumin, HA)是尿液中含量很多的一種蛋白質，其分子量大約有 64,000，在結石中有大量的 HA 發現[27]；HA 可以促進雙水草酸鈣的核心形成[10]，但是 HA 可以減低尿液中的超飽合程度，而使隨後的成長和聚集過程延緩了，所以被推測是抑制因子[10]，然而也有報告認為它對結晶形成沒有任何作用的[147]。血清白蛋白在血漿中有抗氧化的活性，可直接對抗自由基或螯合了有氧化還原活性的金屬如銅或鐵，以抑制自由基的活性[48]，所以人類血清白蛋白如分泌於尿液中會影響其作為緩衝物質的活性，成年人 HA 抗氧化活性會降低[31]，而結石又是成年之後才開始發病，因此可能對於結石的形成有所影響，在這研究中我們以結晶形成的幾個步驟來探討 HA 的角色。

第五節、晶體-細胞間的交互作用

由晶體留存的理論延伸而來的是腎小管受傷與草酸鈣結石形成的關係[66]，這個機轉在人體中很難去研究，但是卻可以從細胞培養的實驗結果來印證[123]。最常見的關聯是高草酸會使培養的腎細胞受傷，草酸根可以增加自由基的產生使得細胞死亡[123]，草酸的效應是經由超氧自由基來傷害近端腎小管細胞，受傷後的細胞剝落物提高晶體結合與腎小管細胞而增加了結石形成的機會，因此抑制自由基的產生可以進一步減少結石形成的機會。

過去幾年對於動物實驗和組織培養的研究報告發現，腎的上皮細胞會與草酸或草酸鈣晶體交互作用[40]，細胞的反應方式各有不同，要視細胞的種類、環境狀況、草酸濃度、有無草酸鈣晶體或其他足以影響的因素有無並存而定。有時候晶體會從尿液排出，有時晶體會附著在上皮細胞上而，從管腔中被吞噬進入細胞內，吞入細胞內的晶體不是被溶體的酵素破壞或是被胞吐作用從基底側排出去，然後和發炎細胞反應。在略高於超穩定以上的草酸鈣濃度下，會促使結晶促進因子分泌，使晶體易於附著、成長和聚集，但是在長期的高草酸濃度下細胞會受傷，細胞受損而暴露出磷脂絲氨酸，然後與鈣交互作用，促進結晶成核以及附著[136]。近端腎小管上皮細胞對此傷害更敏感，傷害細胞的晶體附著方式可能

與未受傷的細胞不同。

受傷的細胞無論有無晶體內噬或附著，最終都會從基底膜脫落出來，剝落的細胞囊泡漿膜適合低過飽和濃度形成的鈣類結石核心停靠，從近端腎小管來的囊泡可以使結晶在遠端腎小管和收集小管內形成。一旦結晶形成後，其後續的過程並不需很高的過飽和濃度就可以繼續進行，在與其他結晶、細胞分解的產物及吸附在基底膜上聚集之後，就會留住不被尿液沖刷出去，然後浸泡在尿液中形成結石初期的病灶[66]。

結石形成的理論很多，從各種實驗結果看來，可能是經過一連串反應之後才形成結石的，而草酸鈣結石很可能是由於形成晶體之後與細胞交互作用的結果。腎上皮細胞暴露在高草酸濃度之後，使得腎細胞受傷，這是開始形成結石的步驟之一。因此疾病的發生有賴於晶體與細胞進一步交互作用，這些複雜的互動關係有待進一步探討。

第六節、以基因多形性來探索複雜性疾病的文獻回顧

單核苷酸多形性(Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs)是人類基因多樣性最豐富的形式[75]，代表了人與人某個基因上單一鹼基的不同。這個基因上鹼基的不同可以造成蛋白質上氨基酸的不同、促進子的不同、插入序列的不同、或者只是單純鹼基的不同，是尋找常見複雜疾病基因遺傳最好的資源，可以用高精準的去氧核糖核酸定序程式獲得大量數據，把疾病相關的基因多形性分布的數據收集後，透過統計及公式之計算[91]，可以了解各種基因之變異所佔的可能發生機率，結石病患或許可以用此方法深入探討其致病基因。

單核苷酸多形性在人口上有特定的比例，且比傳統遺傳學上使用的微衛星重複序列數(microsatellite)多樣性穩定[75]，不會因世代的傳遞而消失；因此它不只代表可能的氨基酸改變而功能改變，而影響了此基因的功能，並且與環境的互動上產生不同的反應能力。除此之外，它也可能聯鎖了某個疾病的基因，使病患容易得病(susceptibility)。在這幾年被使用於檢測複雜性疾病，廣泛使用成基因組上的遺傳標記(marker)，以搜尋可能的疾病病因或其聯鎖基因，如骨質疏鬆症、

癌症、尿路結石以及高血壓等病 [115]。這些病到目前為止，與單一致病因子相關性都不高，無法以傳統的突變分析方法來檢查。

基於上述原理，SNPs 以族群遺傳學的方式提供一個新的研究方法，它需要很多對平均分布的標記去檢驗人口中該多形性的比例。要找尋一些穩定、快速和精確的標記並不是容易的工作，但當累積大量資料後，適合的標記就會逐步出現。出現之後，統計工作可以幫忙分析疾病的相關基因、疾病與環境之間的互動、藥物治療疾病時不同反應與基因多形性的關係、研發新藥，甚至可以來預測某族群的得病機率與種族遷移的分布。

雖然如此，以單核酸多形性的方式尋找疾病基因的連鎖關係仍然是困難的，它並非萬靈丹，需要大量的病人群以排除誤差，要考慮基因在生殖時有重組的現象，同時人類的基因太多了，無法一一檢測，何況疾病本身就很複雜，這些也增加了困難度[85]。目前在結石疾病的單核酸多形性研究尚未建立，僅只有維他命 D 受體基因的研究報告而已[62]，因此尋找一組穩定且完整包含結石的相關基因多形性是刻不容緩的工作。如果能夠大量篩檢相關的基因，才可能找出合適的基因，將來可以運用在分子生物學上的細胞表現及臨床表現，或可幫忙找出結石的疾病基因。

第七節、選用的基因

據估計人類有三萬到五萬個基因，因此要找合適的基因做為標記相當困難，有如大海撈針，從已知的報告和推測與其有關的基因去找多形性是比較容易的方法。以下是本研究所選用的基因與其理論基礎，共有維生素 D 受體基因、破骨素基因、降血鈣素受體基因、p21 基因、白血球介素 β -1 基因、白血球介素-1 受體拮抗基因、雌性素受體基因、雄性素受體基因、以及 p16 基因等。

維生素 D 受體基因

維生素 D 受體基因曾經被用來做為預測停經婦女骨質密度的指標[100]，常用的基因多形性有以 *Fok* I 和 *Bsm* I 來篩檢起始碼和第八插入序列的多形性 [42,51]，從澳洲的雙胞胎婦女研究發現，第八插入序列的多形性與骨質密度有強

烈的連鎖性[100]。然而隨後的流行病學調查卻顯示支持及反對的報告，顯現出族群間的分布比例的差異性[33,36,60,71]。對於結石病患的研究也是出現矛盾的現象，由 Zerwekh 等人的研究並沒有發現 *Bsm I* 的多形性與高鈣尿的結石病人有所關聯[120,153]，但是在非高鈣尿的結石病人的限制可切的同源合子基因型分布頻率比對照組少了很多[120]，顯現出與正常尿鈣的結石患者之間的關聯。Ruggiero 等人則報告了維生素 D 受體基因多形性伴隨著表現功能的變異與乳癌的轉移有關[119]，因此維生素 D 受體基因可能不只跟結石疾病或骨質疏鬆相關[35]，其相關性不只是限於與鈣而已。目前台灣尚無維生素 D 受體基因多形性的研究報告，而國外已有用此多形性作為尿路結石的基因標記的報告[33,71]，因此我們以此作為台灣病人的研究基因的開始。

降血鈣素受體基因

降血鈣素受體(Calcitonin receptor)是七穿膜的 G 蛋白偶合受體[83]，對與鈣相關的降血激素做出反應，此基因曾經被使用於預測停經後婦女骨質密度的指標[93]。常見的多形性位置是位於第 1377 核酸上的 *Alu I* 多形性，其中含有 C/T 鹼基的多形性，使得氨基酸密碼從脯氨酸(proline)變成白氨酸(leucine)[114]。Masi 等人研究義大利的停經後婦女的骨質密度發現，此基因的 C/T 多形性與骨密度大大有關[93]，由於此基因會調控鈣的代謝，所以我們也針對此多形性來探討與鈣類結石病人的相關性。

降血鈣素受體第 1377 核酸上的 *Alu I* 多形性是位於細胞內的第四個功能領域(domain)內[108]，由於這個受體是 G 蛋白偶合的激素受體，細胞內功能領域的任何氨基酸改變可能會影響疾病的形成。氨基酸的不同可能產生信號傳遞過程的改變，最終會影響信號的強弱，使疾病容易形成。降血鈣素抑制成骨細胞的骨質吸收且增加尿液鈣鹽的分泌，這些作用都透過此受體來進行[5]。降血鈣素受體分布在腎小管上皮細胞、睪丸、破骨細胞、腦和卵巢細胞內[11,37,39,92,110]，所進行的信號傳遞路線包括環腺苷酸和磷脂分解，調控鈣和磷脂質的代謝[131,152]。由於磷質的過氧化是結石的可能成因之一[136]，所以此基因多形性可

能不只是透過鈣的代謝來影響結石的形成，還有可能來自於磷脂代謝的改變。

破骨素基因 (Osteocalcin)

破骨素是維生素-k 依賴型的蛋白 (也叫做骨 Gla 蛋白, BGP), 其基因曾被用來作為日本婦女的骨質密度指標[25], 它有一個多形性位置是在促進子的附近, *Hind* III 可以作為篩檢的限制。從第一表現序列上游 198 個核酸位置, 鹼基從 C 變到 T 的多形性, 它曾被用來作為骨質疏鬆的基因標記[25]。由於破骨素的生化合成與骨的形成和鈣的代謝相關聯, 而且受維生素 D 和副甲狀腺素的調控 [82,150], 是研究骨質代謝的重要指標, 目前沒此多形性與結石相關的研究報告。

過去曾有報告破骨素與鈣類結石相關, 測量血清中的破骨素濃度曾被用來作為鈣類結石的高尿鈣症的鑑別診斷的方法[130], Strohmaier 等人曾在臨床觀察到用飲食限制來治療高尿鈣症的結石病人, 必須是破骨素對限鈣飲食不反應的人才有效[130]。同時破骨素也是結石間質蛋白其中之一[96,149], 發生在病理礦化的沉積中有機間質是可以影響結石成長的[65], 因此在結石形成過程中, 破骨素的分泌與隨後嵌入結石中形成間質曾被提出來是影響結晶成核、成長與聚集的因素, 或且也可能是使結石附著在腎小管的蛋白質[96]。基於上述理由, 破骨素可透過很多方式來影響結石的形成, 所以被選用來測量單基因多形性的指標。

白血球介素-1 與其相關基因

由很多報告顯示細胞激素在尿液會出現且與結石形成有關[118,138,143], 白血球介素-1(IL-1)是細胞激素之一, 是前發炎物質, 對於骨關節的炎症和破壞佔有很重要的角色。白血球介素-1 經由刺激白血球介素-6 引發骨頭鈣解離且刺激破骨反應[112], 因此在停經的婦女白血球介素-1 被用來作為預測骨密度的基因標記[76]。同時在高尿鈣症的病人也發現了白血球介素-1 的 mRNA 轉錄增加 [143], 顯示以白血球介素-1 來作為研究草酸鈣結石遺傳標記的可能性, 但是目前尚無此項研究報告出現。

白血球介素-1 β 促進子區、第五表現序列區和受體拮抗基因(IL-1 Ra) 第二表現的序列多形性曾被用來篩檢與婦女骨質疏鬆和類風濕性關節炎的相關性

[8,76]。所以我們就選用這三個常用的多形性位置以聚合 鏈反應的方法，來測試是否可以此作為基因的標記，比較正常人和結石病人的多形性分布情形，評估其差異性，作為風險與易感性的指標。

P21 (WAF1/CIP1)基因

晶體與腎小管上皮細胞交互作用後，會使晶體顆粒留存在腎臟逐漸成長，最後形成結石，最常見的現象就是在培養細胞中給予高草酸，會使腎小管細胞受傷[123]。高草酸使得自由基的產生增加，造成細胞死亡，然後晶體留存在腎臟內，如同前面所述這是形成結石的理論之一[74,136]。p21 (WAF1/CIP1)可能不直接與結石有關但卻與細胞死亡息息相關。

p21 基因所轉譯的蛋白質是分子量 21,000 的蛋白，這個蛋白質有個 *N* 端的功能領域(domain)，可以結合及抑制 cyclin-cdk 複合體，P21 (WAF1/CIP1)因此是細胞週期素依賴激 抑制因子，可以調控細胞週期的檢查點[148]。P21 (WAF1/CIP1)使細胞週期停在 G1 的機制是來自於 p53 的影響，p21 的改變可以使細胞對於受傷後 p53 誘導的細胞週期停止和細胞程序凋亡產生改變。但是在腫瘤細胞卻少有發生突變，而是以多形性出現 [70,81]，最常見的多形性位置是位於表現碼第三十一，鹼基是從 AGC 變成 AGA 而使氨基酸從絲氨酸變成精氨酸，其比率是 91% 比 9% [70]。因此選用的原因是其與細胞受傷後死亡的機制有關。

雌性素受體與雄性素受體

由於男性比女性產生結石的機會是二至三倍，性別與性激素可能對於結石有影響。從閹割的雄性老鼠的結石誘發實驗結果發現，被閹割的雄性老鼠形成結石的機會降低很多[78]，因此雄性可能是促進而雌性素可能是相對的抑制結石的形成[79]。

雄性素受體是固醇類受體的家族之一，很多的生物行為與其有關，如性別的分化、成熟與造精子能力等[46,145]。它有三個鹼基重複的多形性 CAG，位於第一表現碼，使得氨基酸在 *N* 端的地方有不等長的麩氨醯氨排列(glutamine)[28]，這個 CAG 的重複長度多形性與前列腺的疾病如良性增生症與前列腺癌相關[46,61,

126] , Mitsumori 等人發現其長度越短良性前列腺增生的體積就越大[98]。目前少有此多形性與結石相關性的研究。

雌性素受體基因上游的鹼基 TA 重複多形性曾有報告與停經後婦女鬆和前列腺大小有關[122] , 由於此受體是受雌性素調控 , 而且傳遞其信息 , 因此其功能變異可能影響了雌性素對細胞的作用。此外 , 女性的結石病人比較少 , 所以結石的形成在性別間的差別也與其有關。因此它也是我們選用的目標基因。

第八節、小結

結石是一個病因相當複雜的疾病 , 目前僅知其是生物礦化的一個形成過程 , 但因為仍有許多未盡清楚的因子參與其形成 , 所以其預防工作是晦暗未明的。本研究嘗試以生化學的方法來探討生物礦化的機制 ; 在分子生物學方面則以基因多形性的檢驗方式來探索幾個可能的基因相關性 , 以期將來提供基因檢索的參考。找出適合的基因標記 , 透過細胞表現來檢測這幾個基因與細胞間的交互作用。由於尿中的蛋白質如 nephrocalcin、THP 和血清白蛋白是很常見 , 所以我們從這幾個蛋白質在結晶過程中所扮演的角色探討起 , 與分子生物學方向配合 , 期望對結石的生物礦化機制能有更深入的了解。

第四章 材料與方法

第一節、概述

在實驗方法中我們大致分成三部份來進行，分別是：一、尿中蛋白質的純化與結晶實驗，其中包含了結晶形成的三個步驟，並將 TH 蛋白去糖基以觀察其對結晶形成的影響；二、蛋白質細胞與自由基之間的交互作用實驗；三、基因多形性的遺傳學探討。期望從此三個方向去探討生物分子與結石形成的關係。

第二節、儀器設備

本研究所使用之大型儀器設備和其廠商名稱與產地如下：

1. 快速液相層析系統 (Fast Performance Liquid Chromatography system, FPLC) : Pharmacia (Uppsala, Sweden)。
2. 層析管柱系統：Sephacryl S-200, Sepharose 4 B, Mono Q 5/5, 均購自 Pharmacia (Uppsala, Sweden)。
3. 蛋白質電泳系統：Bio-Rad Miniprotean II (Hercules, USA)。
4. 尿液濃縮系統：Spectrum Stirred cell (Houston, USA)。
5. Spectrophotometer：Beckman DU-640 (Palo Alto, USA)。
6. 氨基酸分析儀：Beckman System 6300 (Palo Alto, USA)。
7. 恆溫循環水槽系統：Hotech 631-D (Hotech, Taiwan)。
8. 聚合 鏈反應機器：Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 2400 (Foster City, USA)。
9. 高速離心機：Beckman Model J2-21 (Palo Alto, USA)。
10. 離心機：Kubota 5800 , Kubota 1300 (Japan) , Biofuge 12000 (Germany)。
11. 冷凍乾燥機：Dura-Dry (FTS system, New York, USA)
12. 瓊膠電泳系統：Cosmo Bio. Mupid-2 mini gel migration through (Japan)。
13. 核酸染色照相系統：Evergene gel analysis system (England, UK)。

第三節、實驗試劑

1. 蛋白質電泳標記：BDH Electran (Poole, England)。

- 2.Sigma : St Louis, USA。
- 3.DNA 抽取試劑 : Genomaker (Bloosm, Taipei)。
- 4.Merck : Damstadt, Germany。
- 5.電泳試劑和蛋白質定量試劑 : Bio-Rad (Hercules, USA)。
- 6.聚合 : Perkin Elmer Taq polymerase (Foster City, USA)。
- 7.限制 : New England Biolabs (Beverly, USA)。

第四節、尿液收集與濃縮方法

我們收集沒有結石的正常成年男子尿液標本，在收集前每位提供尿液的志願者均先以超音波掃描腎臟以排除腎結石的可能，收集時標本保持在 4℃ 的冰桶中，收集桶中加入 Sodium azide (0.02% W/V) 和 5 μM phenylmethanesulfonylfluorid (PMSF) 當作保存劑，尿液以試紙測試有無血尿存在，若有則不收集。尿液標本在收集後以 0.22 μm 過濾膜過濾 (Millipore, Bedford, USA) 然後存於零下 70℃ 冰箱。

尿液標本的超過濾法：將尿液標本以 stirred cell 的系統過濾成原來的十分之一量，利用 5000-Dalton 分子過濾膜以及氮氣加壓至 25cm 水柱壓來完成，其過程均在 4℃ 冷房完成。

第五節、蛋白質的液相層析

甲、腎調鈣素

根據中川泰等人的報告，腎調鈣素可以由透析和三道液相層析的步驟來純化 (DEAE, P-10, and S-200) , [103]本研究以 FPLC 系統將它簡化成兩道步驟，簡明的說，將濃縮的尿液標本注入 Sephacryl S-200 的管柱內 (管柱容量 200 毫升)，以 0.02 M Tris pH 7.3 的緩衝液將蛋白質沖提出來，再以 Mono Q 5/5 的管柱作為最後的純化步驟，離子交換層析的氯化鈉線性梯度是從 0 M 到 0.25 M 的 Tris 0.02 M pH 7.3 緩衝液，本層析法是以快速液相層析系統 (Pharmacia, FPLC) 作為純化的系統。層析後的沖提液在與 0.05M EDTA, pH7.9 保持 4 反應四天 [103]，處理後之溶液經水的透析一天且換兩次，再冷凍乾燥保存。

高效液相層析系統 High-performance liquid chromatography (HPLC)

標本加入百分之十的三氟醋酸(TFA)然後離心十分鐘 (6,000 g), 上輕液注入反向的層析管柱 (Waters, Bondapak TM, C-18, Milford, MA, USA), 管柱先以 10 % TFA 平衡, 蛋白質再以 0 至 10 % 的 DMSO 梯度沖提出來。

氨基酸分析

標本在真空密封的試管內以 6N 鹽酸分別以 110 水解 24, 48 及 72 小時, 水解液溶解於檸檬酸鈉 pH 2.0 的緩衝液中, 在真空中抽取硫酸並以氨基酸分析儀分析氨基酸成分, 其成分是以氨基酸在總組成所佔的比率來表示。

乙、Tamm-Horsfall 蛋白的純化

純化的步驟是根據 Grover 等人的報告來進行的[43], 尿液標本先加入氯化鈉至 0.58 M 的濃度, 在 4 冷房中攪拌 48 小時, 溶液再以 4 , 10,000 X g 離心 20 分鐘, 上輕液倒出, 沉澱物再溶於去離子蒸餾水中 (deionized distilled dd water), 此沉澱法重複兩次, 溶液在 4 經水的透析一天且換兩次, 標本再打入 Sepharose 4 B (2 X 100 cm column) 的液相層析管柱, 然後以 0.05 M Tris-HCl pH 7.4 沖提出蛋白質, . 溶液經水的透析一天且換兩次, 再冷凍乾燥保存於-70 。

丙、血清白蛋白的純化

血清白蛋白購自於 Sigma, 首先以 Sephacryl S-200 管柱和 20 mM Tris-HCl pH 7.3 沖提作為第一道純化步驟, 然後以 mono Q column 並 20 mM Tris-HCl NaCl, pH 7.3 緩衝液沖提, 血清白蛋白以 0 到 0.3 M 的 NaCl 梯度經過離子交換管柱, 沖提液收集後, 在 4 以 dd 水透析一天, 期間換水兩次, 再冷凍乾燥保存於-70 。

丁、酵素移除唾液酸的實驗

TH 蛋白(2 mg/ml)或以血清白蛋白加入等量的醋酸鈉與醋酸緩衝液(90 mmol/L, pH5.5)內含氯化鈉(0.3 mol/L)、氯化鈣(18 mmol/L)以及 neuraminidase (7 U/L) (Sigma, St Louis, USA)泡成水溶液, 保持 37 一天, 再以水透析兩天, 並在期間更換水三次, 去醣基效果以 SDS-PAGE 證明。

第六節、蛋白質之電泳、染色與定量

甲、蛋白質濃度的測量

蛋白質濃度的測量方法是 Bradford 氏分析法[19]，把蛋白質 800 μ l 分別加入試管中，每根試管再加入 200 μ l 的 Bio-Rad 公司的染料試劑，震盪均勻，反應五分鐘後，移至石英玻璃管中，以分光光譜儀測量 595 nm 波長的吸收值，其數值再以已知濃度的胎牛血清蛋白質溶液做比較，以內插法算出線性迴歸的數值。

乙、聚丙烯醯胺膠質電泳 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

取 20 μ l 的蛋白質再加入 5 μ l 的 SDS 載負緩衝液(50mM 的 Tris-HCl pH 6.8、100mM 的 dithiothreitol、2%的 SDS、0.1%的 bromophenol blue、和 10%的甘油)，放入沸水中 5 至 10 分鐘，再低速離心一下，把此一混合物加入聚丙烯醯胺膠 (4%的 stacking gel 和 12%的 separating gel)內，再把聚丙烯醯胺膠放入 Tris-glycine 電泳緩衝液(25mM 的 Tris-HCl、250mM 的 glycine pH 8.3、和 0.1%的 SDS)內，用 100V 跑二小時。

把跑好的膠放入 10%的醋酸溶液中固定 10-15 分鐘，再放入 10%的酒精溶液中洗 5 分鐘，再把膠片放入新鮮混合的重鉻酸鉀溶液 (1g/L) 和硝酸溶液 (0.2 ml/L) 的混合液中 5 分鐘，再用去離子水輕洗三次，每次 2 分鐘，共 6 分鐘，再放入硝酸銀染色液 (2g/L) 中染色 20 至 30 分鐘，用 dd 水輕洗 20 秒，再把膠放入新鮮混合的碳酸鈉溶液 (30g/L) 和福馬林溶液 (0.5 ml/L) 的混合液中，顯影二到三次，共 5 到 20 分鐘，再放入 10%的醋酸中，使反應停止，再用去離子水洗去 10%的醋酸。

第七節、結晶三大步驟的實驗方法

戊、製備草酸鈣晶種

緩緩的加入 100 毫升的 0.25M 草酸鉀溶液至 100 毫升的 0.25M 的氯化鈣溶液上，不停的攪拌，並維持在 85°C 下，直到此溶液的 pH 值降至 4.0 為止。再攪

拌 8 小時，然後靜置整夜。靜置後，把上清酸液緩緩倒掉，用去離子水洗這些晶種，洗得此混和液的 pH 值升至 6.5。製備好之晶種用紅外線光譜檢查確定為單水草酸鈣。

乙、結晶成核的抑制作用

先分別配好 100 毫升 8.5mM 的氯化鈣溶液(內含 200mM 的氯化鈉和 10mM 的醋酸鈉，pH 5.7 緩衝溶液) 和 100 毫升 1mM 的草酸鉀溶液 (內含 200mM 的氯化鈉和 10mM 的醋酸鈉，pH 5.7 緩衝溶液)，而在使用前先用 0.22 μ m 的 Millex-GV 膜過濾，以去除會影響實驗的大分子。

取 1ml 的 8.5mM 的氯化鈣溶液加入石英管中，在 37 $^{\circ}$ C，500rpm 下均勻的混合，再加入 1ml 的 1mM 的草酸鉀溶液，至終濃度為 4.25mM 的鈣離子和 0.5mM 的草酸根離子，在 OD₆₂₀ 下，測 10 分鐘，每 20 秒測一次[51]。

影響晶體成核活性的計算方法如下：

算出其吸光值改變量到達 control 最高吸光值的 2.5% 時所需之時間。

丙、結晶成長的抑制實驗

將單水草酸鈣晶種取出，懸浮在 50mM 的醋酸鈉緩衝溶液中 (pH 5.7)，內含 96mM 的氯化鈉；晶體濃度約 1.5 mg/ml。再把此 3 ml 的晶體混合液，加至 33ml 超穩定 (metastable) 的草酸鈣溶液中；此溶液含有 0.833mM CaCl₂ 及 0.167mM 的草酸鈉，俾使晶種的最終濃度維持在 0.125mg/ml 以上[104]。加入 1-100 μ M 的蛋白質至 1 ml 的晶體生長反應溶液，並維持在 37 $^{\circ}$ C，讓其反應 40 分鐘。反應後，讓溶液通過 0.2 μ m 孔隙的濾膜，去掉晶體，再用 214nm 的光源測此澄清液的吸光值，每 20 秒測一次[97]。實驗均進行三次，取平均值為統計之用。

晶體的成長抑制以下列方式計算

$$\text{抑制百分比(\%)} = A_o - A_i / A_o$$

A_o 是 400 秒時對照組的吸光值變化，A_i 代表加入蛋白質時的吸光值變化，

IC₅₀ 的數值是以線性迴歸法求得，X 軸是蛋白質的濃度，Y 軸是抑制百分比。

丁、結晶聚集的抑制實驗測定

這個實驗可以測得在懸浮液中的單水草酸鈣聚集的速度，和在當有蛋白質存在時，對單水草酸鈣的聚集速度是否有影響。將單水草酸鈣晶種取出，懸浮在 10mM 的醋酸鈉緩衝溶液中（pH 5.7），內含 90mM 的氯化鈉，晶體濃度約 0.8mg/ml，再將此一懸浮液小心的混合均勻，再放在超音波下震盪 60 分鐘，並放在 37℃ 下至隔天，在要使用之時，要再一次的檢查 pH 值，並再放在超音波下震盪 30 分鐘。取出上面的懸浮液 14.5ml，再加入 0.5ml 的蛋白質，以 29：1 的比例下，在 37℃，150rpm 下搖動 2 個小時，2 個小時後，再把此溶液混合均勻，再快速的取出 2ml 加入比色管中，再放入分光光度計中，在 1100rpm，37℃ 下，用 OD₆₂₀ 測至吸光值穩定經過 10 秒，再在 500rpm、37℃ 下，用 OD₆₂₀ 測其吸光值至 180 秒，停止攪拌使單水草酸鈣晶體發生自發性的沉澱，用 OD₆₂₀ 測其吸光值至 480 秒，每 20 秒測一次[53]。

影響晶體聚集活性的計算方法如下：

$$\text{抑制百分比 \%} = \left[(S_0 - S_t) / S_0 \right] * 100\%$$

S₀ 是未加蛋白質的吸光值下降斜率，S_t 是有加抑制蛋白的吸光值下降斜率。

第八節、自由基的反應實驗（Xanthine oxidase inhibition assay）

取出 6.084mg 的 xanthine 加入 200ml 的 0.1M PBS、pH 7.4 的緩衝液，慢慢的加熱和混合，直到 xanthine 完全的溶解為止，成為 200μM 的 xanthine buffer；再取出 990μl 的 xanthine buffer，加入 2μl 的 xanthine oxidase（0.04 units），和 10μl 的蛋白質，在室溫下用 OD₂₉₅ 測 4 分鐘，每 10 秒測一次。[13]。對照組則是以 10 μl 0.1 M PBS 來代替蛋白質。IC₅₀ 值是以線性迴歸測得，X 軸是蛋白質濃度，Y 軸是酵素活性抑制的百分比。

第九節、結石病患與正常人 DNA 的收集

對照組是年齡超過四十歲的健康人，沒有家族結石病史、沒有結石疾病、且目前腎臟超音波沒有腎的任何鈣化斑影存在，尿液常規檢查並無顯微血尿的存在，結石的病人是來自於台中地區的復發型的草酸鈣結石病患，生化及尿液檢查排除了高血鈣症、高尿酸血症及高草酸尿症的病人，如果病人在結石治療期間有尿路感染的病徵時也排除在本研究之外，無論正常人與結石病人抽血時均徵求其同意後施行，結石分析是用紅外線光譜儀證明是單水草酸鈣、雙水草酸鈣或二者之混合。DNA 的萃取是以 Genomaker 的套件試劑來進行抽取白血球的 DNA。

第十節、聚合 鏈反應 (Polymerase chain reaction, PCR)

本研究所進行的聚合 鏈反應均以可以程式控制熱循環溫度的 GeneAmp PCR 系統 2400 (Perkin Elmer)，聚合 是 0.25 units 的 AmpliTaq DNA polymerase (Perkin Elmer)，所採用的引子序列、限制 以及 PCR 產物均以 Table 1 詳列。

表一、聚合 鏈反應所用的引子序列與其相關條件

基因名	多形性位置	引子序列	反應產物	限制	酵素反應產物
維生素 D 受體	第八插入序列	5' -CCG GACACAGCCTGAG CTG-3' 5' CAGCGGGAAGAGGTCAAGG G-3'	580 bp	<i>Bsm</i> I	405 bp, 175 bp
維生素 D 受體	開始密碼子	5' -AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCT CT-3' 5' -ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCT C-3'	265 bp	<i>Fok</i> I	169 bp, 96 bp
降血鈣素受體	第 1377 核酸	5' -CTCAGTGATCACGATACTGTG-3' 5' -ATTCAAGTGAACAGCGTTGG-3'	228 bp	<i>Alu</i> I	120 bp, 108 bp
p21 基因	31 密碼子	5' -GTCAGAACCGGCTGGGGATG-3' 5' -CTCCTCCCAACTCATCCC GG-3'	272 bp	<i>Blp</i> I	89 bp, 183 bp
破骨素	第一表現序列 198 bp 之上 游啟動子	5' -CCGCAGTCCCAACCACAATAAGCT-3' 5' -CAATAGGGCGAGGAGT-3'	253 bp	<i>Hind</i> III	232 bp, 21 bp
白血球介素 Iβ	啟動子	5' -TGGCATTGATCTGGTTCATC-3' 5' -GTTTAGGAATCTGGACCAGA-3'	304 bp	<i>Ava</i> I	190 bp, 114 bp
白血球介素 Iβ	第五插入序列	5' -GTTGTCATCAGACTTTGACC-3' 5' -TTCAGTTCATATGGACCAGA-3'	249 bp	<i>Taq</i> I	135 bp, 114 bp
白血球介素 I 受體拮抗蛋白	第二插入序列	5' -CTCAGCAA-CACTCCTAT-3' 5' -TTCAGTTCATA-TGGACCAGA-3'	410 bp: I, 240 bp: II	<i>VNTR</i>	
雄性素受體	第一表現序列	5' -TGCGCGAAGTGATCCAGAAC-3' ; 5' -CTTGGGGGAGAACCATCCTCA-3'	168-23 4 bp	<i>CAG</i> 重 複	
雌性素受體	基因 1174bp 上游	5' -GACGCATGATATACTTCACC-3' 5' -GCAGAATCAAATATCCAGATG-3'	160-19 8 bp	<i>TA</i> 重 複	

維生素 D 受體基因第八插入序列 *Bsm* I 多形性

限制 切割的位置是設計於 TGC 的位置，酵素反應在 37 三個小時，對偶基因分別是可切的同型合子(bb)、不可切的同型合子(BB)和異型合子(Bb)。

維生素 D 受體基因開始密碼子 *Fok* I 多形性

限制 切割的位置是設計於 ATG 的位置，酵素反應在 37 三個小時，對偶基因分別是可切的同型合子(TT)、不可切的同型合子(CC)和異型合子(TC)。

降血鈣素受體基因 *Alu* I 多形性

根據 Masi 等的報告[93], 限制 切割的位置是第 1377 個核苷酸 T/C 多形性，聚合 鏈反應的產物為 228-bp 長，切割後為 120-bp 和 108-bp 兩段，因此多形性的對偶基因就有可切的(TT)同型合子、不可切的(CC)同型合子與半切的(TC)異型合子。

p21 蛋白

本實驗所用引子序列是根據 Li 等人的報告[81]，聚合 鏈反應的產物為 272-bp 長，切割後為 89-bp 和 183-bp 兩段，多形性的對偶基因就有可切的(CC)同型合子、不可切的(AA)同型合子與半切的(AC)異型合子。

白血球介素一

本實驗引子序列是根據 Cantagrel 等人的報告[8]，白血球介素一 啟動子多形性是位於上游-511 的位置，聚合 鏈反應後的產物以 *Ava*I 切割，“C”對偶基因在電泳上會是 190-bp 和 114-bp 長，而“T”對偶基因則會是 304-bp 長；白血球介素一 表現序列 5 多形性則以 *Taq* I 來切割，“E1”等級是 135bp 加 114bp 長，“E2”等級則是 249bp 長；白血球介素一受體拮抗基因，第二插入序列的 86-bp 前後銜接重複變異數 (variable number tandem repeat, VNTR) 分成“I”等級是 410-bp、“II”等級是 240-bp、“III”等級是 500-bp、“IV”是 325bp 而 595bp 的長度是“V”等級。

破骨素基因多形性

本實驗引子序列是根據 Dohi 等人的報告[25]，聚合 鏈反應的產物為 253 bp

長，切割後為 232-bp 和 21-bp 兩段，多形性的對偶基因就有可切的(TT)同型合子、不可切的(CC)同型合子與半切的(CT)異型合子。

雄性素受體與雌性素受體

雄性素受體的 CAG 重複區是以聚合 鏈反應來放大的，順向引子序列的尾端以 5-carboxyfluorescein (FAM)螢光標示，雌性素受體的(TA)_n 重複方法與雄性素受體的實驗是相同的，適量的聚合 鏈反應後產物(0.75 μ l)混合 1.75 μ l 已事先配好的溶液 (formamide: loading buffer (blue dextran, 50 mg/ml; EDTA, 25 mM):standard=5:1:1)，使用 Genescan-350 TAMRA 為分子量的參考標準 (6-carboxy-tetramethylrhodamine, red) (PE, USA)，然後在 6% denaturing polyacrylamide gel 進行電泳，分析是以 377 DNA Sequencer 來操作，資料以 GeneScan Analysis 2.1 軟體分析其重複長度(PE, USA)。

雄性素受體的 CAG 重複區的聚合 鏈反應後產物長度從 168 bp (內含 9 個 CAG 重複與 141 bp 個側翼放大區) 到 234 bp (31 個 CAG 重複)。其基因型根據其重複長度 9 到 31 分別命名，在電泳時我們以標準的長度標記作為參考。

雌性素受體的 TA 重複長度檢驗方法同上，其基因型根據其重複長度 13 到 22 分別命名。

第十一節、核酸之電泳、限制 反應與照相

通常以 10 μ l 的聚合 鏈反應產物載入 3% 瓊膠中，內含 ethidium bromide 螢光劑，在電泳結束後以核酸染色照相系統拍照，並據以判別其結果。

第十二節、電腦資料的處理

本實驗的統計以微軟公司出品的視窗軟體和試算軟體 EXCEL 來初步進行卡方試驗運算，Student-*t* 試驗也是以此方法運算；卡方試驗常用於基因單核酸多形性的分布差異檢驗，但是當卡方試驗中標本數少於 30、其中單一數值低於 1 或者是五分之一以上的數值低於五時，我們採用費雪氏精確檢驗，風險對比值 Odds ratios (OR)和 95% 信賴區間 (CI)則用來測試特定基因組中多形性與疾病易

感性的關聯性，當 p 值低於 0.05 時兩組之間的差異即視為有顯著性。

第四章、結果

第一節、概述

在實驗結果中亦分成三部份：一、尿中蛋白質的純化與結晶實驗，其中包含了結晶形成的三個步驟，並將 TH 蛋白去糖基後對結晶形成的影響；二、蛋白質細胞與自由基之間的交互作用實驗；三、基因多形性的遺傳學探討。期望從此三個方向去探討生物分子與結石形成的關係。

第二節、蛋白質的純化

液相層析與 SDS-PAGE 電泳

THP 蛋白出現在沖提波峰的高峰（圖一），THP 蛋白的 12 % SDS-PAGE 電泳和銀染色顯示是 80 kDa，而白蛋白則接近 60 kDa（圖二及圖三），顯示此純化方法可以得到很純的蛋白質。在經過酵素去唾液酸反應後可見 THP 蛋白染色帶為有下移的現象，約 75 kDa，白蛋白則沒有下移的現象，代表 THP 有糖基，而白蛋白可能沒有此糖基可被切除。

尿液中分子量較大的生物分子可以由 Sephacryl S-200 過濾層析法來去除，12-14 kDa 的分子留存的容積是在 200-350 毫升，沖提出的液體中出現最大的抑制活性是在 200-300 ml，圖四是離子交換層析 0 到 250 mM NaCl 的梯度的沖提圖。高效液相層析法是用來測試腎調鈣素(NC)的純度，它顯示波峰經與原始發現者 Nakagawa 討論確認是腎調鈣素[103]。

第三節、蛋白質的結晶抑制實驗

THP 蛋白與白蛋白的結晶抑制實驗

THP 蛋白與白蛋白加速了結晶的成核反應，此種促進反應在蛋白質濃度逐漸升高時也隨著增加，100nM 的 THP 蛋白能夠降低 T_i 時間 15.4 秒（表一），白蛋白也在 100nM 時有能力降低 T_i 時間 7.4 秒，去唾液酸後的 THP 蛋白仍然可以促進成核只是時間變慢了。在結晶成長實驗中，THP 蛋白的 IC_{50} 是 7.27 nM，而去糖後是 48.23nM；白蛋白則從 37.45nM 到經去唾液酸處理的 30.92nM，可

見白蛋白並無唾液酸的醣基，在實驗中作為一個負的對照。

THP 蛋白對結晶的聚集實驗發現是個雙向型的表現，當濃度低於 500 nM 時，濃度升高時聚集反應受到抑制，但是濃度在 500 nM 至 1000 nM 後則逐漸失去意志能力甚至出現促進的現象（表二），這些反應在去除唾液酸後也失去其部分作用；白蛋白最大的抑制能力 72.73 % 在 100 nM 時出現，但在增加濃度後抑制能力即不再增加。經酵素處理後期最大抑制濃度則出現在 500 nM。

腎調鈣素的 IC_{50} 是 284.6 nM，此結果是以線性迴歸求得， $y=0.1692x+1.8367$ （表三），由 SDS-PAGE 電泳結果發現，在與銅離子與維生素的交互作用中，腎調鈣素可以被切成兩個勝（圖五），分子量約為 8 kDa 和 6 kDa，銅離子在生理濃度時不會影響腎調鈣素的結合作用，但是在維生素 C 的作用下與鈣的結合作用可能因為蛋白質鏈斷掉而失去作用。

第四節、自由基實驗

黃 呤氧化 抑制實驗結果是以百分之五十抑制濃度（ IC_{50} ）來表示，在白蛋白是 10.7 nM 而經酵素處理後的白蛋白是 11.9 nM，THP 則顯示酵素處理後明顯的升高濃度（降低抑制力）， IC_{50} 從 69.6 nM 到 102.0 nM（表四）。

第五節、基因多形性的遺傳學研究

降血鈣素受體基因多形性

總共有 102 位病人，其中 72 位是男性，30 位是女性，均是有兩次以上草酸鈣結石發作的病史，年齡由 23 歲至 76 歲（平均 44.6 ± 12.01 歲），對照組則是 60 位男性及 45 位女性，年齡由 40 歲至 87 歲（平均 53.0 ± 10.1 歲），電泳結果有三種可能現象，即酵素可切的同源合子(TT)或不可切的同源合子(CC)以及半切的異合子(TC)（圖六），各種基因型發生的頻率將列在表四。

對照組的不可切的同源合子(CC)佔 94.3%，5.7 % 是異型合子，而可切的同源合子(TT)則是 0.0 %，以費雪氏精確檢驗發現，降血鈣素受體基因多形性的分布在正常人和病人之間是有所差別的($p < 0.01$)，而以男性更明顯($p < 0.0001$)，女性則較不顯著($p = 0.205$)（表六和表七），我們發現只有病人有 TT 同源合子，正

常人降血鈣激素受體第 1377 核酸 C/T 多形性的對偶基因頻率是正常對照組 C:0.97 而 T:0.03，在結石病人則是 C:0.86 而 T:0.14，T 型對偶基因的風險對比值 (odds ratio) 是 5.634，其 95% 信賴區間是 2.286 至 13.885。

破骨激素基因 *Hind* III 多形性

電泳結果有三種可能現象，即酵素可切的同源合子(TT)或不可切的同源合子(CC)以及半切的異合子(TC) (圖七)。對照組的 TT 同源合子的頻率是 42.9%，TC 異型合子是 45.7%，而 CC 同源合子則是 11.4%，對偶基因 T 的比率在對照組與病人是非常接近的(42.9%比42.2%)，以卡方試驗統計發現破骨激素基因 *Hind* III 多形性 (表八)，在正常對照組與結石病人之間是沒有顯著差異的($p=0.978$)，進一步分成男性與女性組別 (表九與表十)，其統計上仍然沒有顯著差異，正常對照組的 T 對偶基因的頻率是:0.657 而 C 是:0.343，結石病人則是 T: 0.657 而 C: 0.343。

p21 基因 31 密碼子多形性

分成可切的 CC 同源合子和不可切的 AA 同源合子以及 C/A 異型合子，兩組之間的基因型分布頻率列在表十一，以卡方試驗統計得知，p21 基因第三十一密碼子多形性在正常對照組與結石病人之間分布是有顯著差別的($p<0.05$)，對照組的絲氨酸同源合子(CC)分布頻率是 18.6%，50.0% 是異型合子(C/A)，而精氨酸同源合子(AA)則是 31.9%，精氨酸在病人組則有較低的出現頻率(16.8%)，對偶基因在對照組的分布是 C:0.43 和 A:0.57，病人組 C:51.1 和 A:48.9；因此絲氨酸在結石的危險對比值 (odds ratio, OR) 是 1.39，而 95% 信賴區間是=0.94~2.04，在性別的分布上並沒有顯著的差異 (表十二及十三)。

維生素 D 受體 *Fok* I 及 *Bsm* I 多形性

圖八電泳圖是 *Fok* I 反應後分成可切的 TT 同源合子和不可切的 CC 同源合子以及 TC 異型合子，兩組之間的基因型分布頻率列在表十四，以卡方試驗來統計，維生素 D 受體開始密碼區 *Fok* I 多形性在兩組的分布是有顯著差異的($p<0.05$)，CC 同源合子在對照組是 23.3%，而 TT 同源合子是 28.9%，至於異型

合子則是 47.8 % , CC 同源合子在病人組是 37.0% , 比對照組高很多 , 因此維生素 D 受體 *Fok I* 的多形性似乎與草酸鈣結石病人有關聯性 , 以對偶基因出現的頻率統計發現 : 對照組的 C:0.47、T:0.53 , 而結石病人 C:0.60、T:0.40 , C 對偶基因的風險對比值是 1.672 其 95% 信賴區間為 1.149 ~ 2.432。

至於 *Bsm I* 的多形性電泳圖顯示於圖九 , 分布頻率分成不可切的 BB 同源合子、可切的 bb 同源合子與半切的異型合子列表於表十五。以費雪氏精確試驗檢查維生素第八插入序列多形性 , 發現在兩組之間並無顯著差異($p=0.89$) , 基因型的分布頻率在 BB 同源合子是 86.6%、bb 同源合子是 10.0%而異型合子是 3.3% , 與病人組的 88.7%、3.2% 及 8.1% 是很接近的 , 再以對偶基因頻率來看對照組是 B: 0.92、b: 0.08 , 而病人組是 B: 0.93、b: 0.07 , 也很接近 ; B 對偶基因的風險對比值是 1.162 , 其 95 % 信賴區間是 0.569 ~ 2.372。

白血球介素一 基因和受體拮抗者基因多形性

以費雪氏精確試驗統計 , 在白血球介素一 基因第五表現序列多形性在病人與對照組之間並沒有統計學上的差異 (表十六 , $p=0.403$) , 同時白血球介素一基因在啟動子區域的多形性也是如此 (表十七 , 卡方試驗 , $p=0.627$)。

圖十是白血球介素一受體拮抗者基因多形性的前後銜接重複變異數“T”的同源合子 , “II”的同源合子和“I/II”異型合子 , 本實驗並未發現“III”、“IV”和“V”的對偶基因 , 其出現的基因型頻率列於表十八 , 以費雪氏檢驗發現 , 在正常人和結石病人之間有顯著的差異($p<0.01$) , 對照組的“T”同源合子是 89.3 % , 而結石病人是 97.9 % , 結石組並且沒有“II”的同源合子 , 對偶基因的頻率在對照組是 I: 0.94 而 II: 0.06 , 結石組則是 I: 0.99 而 II: 0.01 , 因此“T”對偶基因其風險對比值是 6.041 , 其 95% 信賴區間是 1.683 至 21.687。

雄性素受體基因 CAG 重複多形性

男性病人與正常人的雄性素受體基因多形性對偶基因頻率分布並沒有統計學上的差異(圖十一 , $p=0.828$) , 基因型的百分比由 10 到 31 和 42 到 43 的 CAG 重複在結石病人是 : 1.0, 0, 1.9, 0, 1.9, 1.9, 0, 4.8, 3.8, 8.6, 9.5, 16.2, 8.6, 14.3, 10.5,

3.8, 4.8, 1.9, 1.0, 1.0, 1.0, 1.0, 1.9, 1.0 ; 正常對照組為 : 0, 0, 1.9, 0, 0, 1.9, 0, 1.9, 1.9, 3.7, 11.1, 37.0, 11.1, 14.8, 11.1, 1.9, 1.9, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0% , 兩組在男性賀爾蒙的血清濃度並沒有差別 , 由圖十一可見主要的 CAG 重複高峰是 21 個重複 , 結石病人是 16.2% , 而對照組為 37.0% , 因此我們進一步分組成 21 重複與非 21 重複將兩組作比較 (表十九) , 發現兩組有統計學上的差異 ($p=0.018$) , 男性並患有比較低的 21 重複頻率 (OR=0.328, 95% CI=0.154 ~0.701) , 亦即雄性素受體基因有 21 重複的男性較其他基因型不易有結石病。

女性病人與正常人的雄性素受體基因多形性頻率分布並沒有統計學上的差異 (圖十一 , $p=0.157$) , 基因型的百分比由 14 到 29 的 CAG 重複在結石病人是 : 0, 0, 0, 4.7, 6.3, 7.8, 21.9, 26.6, 6.3, 9.4, 4.7, 9.4, 1.6, 1.6 ; 正常女性對照組 : 1.2, 0, 2.4, 1.2, 7.1, 3.6, 10.7, 16.7, 16.7, 11.9, 9.5, 7.1, 7.1, 2.4, 1.2, 1.2%。主要的重複高峰亦是 21 重複 , 結石病人是 37.5% , 正常對照組是 23.8% (對偶基因頻率) , 分組成 21 重複和非 21 重複比對後發現並無統計學上差異 (表二十 , $p=0.202$)。

雌性素受體基因 TA 重複多形性

男性病患在雌性素受體基因 TA 重複多形性的對偶基因頻率分布與正常對照組是有統計學上差異的 (圖十二 , $p=0.001$) , 重複數的分布百分比在結石病人從 10 重複和 13 到 27 重複 : 10.3, 18.4, 23.1, 17.9, 6.4, 1.7, 3.8, 3.8, 2.6, 2.6, 3.0, 3.0, 2.1, 0.8, 0.4, 0 ; 正常對照組是 : 0.9, 8.8, 21.9, 19.3, 14.0, 2.6, 0.9, 4.4, 2.6, 3.5, 5.3, 3.5, 6.1, 2.6, 2.6, 0.9%。主要的 TA 重複高峰是 14 重複在病人是 29.9% , 而在對照組是 35.1% , 經過我們進一步分組後 , 兩組並沒有統計學上差異 (表二十一 , $p=0.491$)。

女性病患在對偶基因的頻率分布是從 13 到 26 : 8.1, 25.8, 17.7, 17.7, 1.6, 0, 6.5, 4.8, 3.2, 9.7, 1.6, 0, 1.6, 1.6 ; 對照組是 : 11.1, 21.1, 16.7, 16.7, 1.1, 3.3, 4.4, 2.2, 4.4, 4.4, 5.6, 3.3, 4.4, 1.1% , 兩組的分布在統計學上沒有差異 (圖十二 , $p=0.753$) 結石病人含有 14 重複的對偶基因頻率是 41.9% , 對照組則是 42.2% , 分組做比較 14 重複與非 14 重複發現並沒有統計學上差異 (表二十二 , $p=0.980$)。

我們將以上結果摘要列於表二十三。

第五章、討論

傳統上結晶的實驗常在純化一個生物巨分子後僅做一個或兩個結晶步驟，由於沒有統一的研究方法使得草酸鈣結晶形成的抑制實驗結果相當分歧[43]。但是由於 THP 蛋白和白蛋白是尿液中最常見的蛋白質，每日分泌量從 20 毫克到 80 毫克[59]，而草酸鈣的尿液濃度約為 0.5 至 5 μ M，因此能夠降低草酸鈣離子濃度過飽和程度的應該是此兩種蛋白質較合乎濃度需求，所以必須先探討清楚，把所有結晶的實驗步驟完整的做完。

TH 蛋白和白蛋白在整體結果上是有抑制草酸鈣結晶形成的作用，這個作用是透過促進成核然後抑制隨後的結晶晶體成長和聚集來進行的。Grover 等人提出 TH 蛋白要在高劑量時才能有抑制作用[44]，但是我們的數據卻在 nM 的濃度即能有抑制晶體成長和聚集的作用。TH 蛋白和白蛋白能抑制晶體成長(510 nM = 22%)，但不能抑制聚集，而 Grover 等人則是以碳¹⁴的沉澱法來做實驗，因此這結果的不同可能是實驗設計上的造成的差異，至於晶體成核的促進作用我們的數據是與 Cerini 和 Hallson 等人相同[10,50]。

TH 蛋白是 616 個氨基酸的蛋白質，含有 48 胱氨酸及 *N*-端連有唾液酸的醣基[73]，這段唾液酸在被酵素切除後使 TH 蛋白的整體抑制能力下降，Hallson 也證明了 TH 蛋白若沒有唾液酸會失去抑制結晶聚集的能力[50]。本實驗顯示唾液酸不僅有結晶聚集抑制能力而且也有抑制成長的能力，Knorle 等人也報告了唾液酸在 TH 蛋白參與結石形成有扮演一定的角色[67]，而遠端腎元的醣腎盞上若增加了唾液酸，可能使得結石容易形成，或者使得微晶體容易附著在腎的上皮細胞上[56]，因此唾液酸可能與結石的形成有關。

白蛋白可以抑制晶體成長和聚集，因為白蛋白可以促進晶體成核使得後續飽和濃度下降，所有作用總合使白蛋白是一個結晶的抑制因子[10]。然而，成年人白蛋白有氧化和還原兩型[31]，而氧化型的抑制能力是缺乏的，因此使得白蛋白的抑制能力有所變化，成年人若是氧化濃度比例過高可能因此降低了抑制能力，促進了結石的形成，這一點有待將來進一步研究。

蛋白質影響了草酸鈣晶體的形成是可以確立了，也就是說蛋白質能參與結晶形成的過程。但由於酸鹼值、離子強度和無機離子濃度都會影響生物巨分子與晶體的交互作用[29]，而我們所做的礦化機制實驗是在理想狀的化學態下進行的，對於生物礦化機制的理解必須在將來步走向模擬實際尿液的狀況來做。

維生素 C 跟結石形成的相關性已被討論很久了，但仍尚未有定論[23]。過去曾被提出來維生素 C 在肝被轉化成草酸然後以 40% 的總比例從尿分泌出去[3]，但是維生素 C 在大量服用下並不需經肝的轉化就可直接分泌到尿裡面去，因此它也可以直接干擾草酸鈣晶體的形成不必間接經過轉化[132]。而且維生素 C 在水溶液中是強的還原劑可以還原二價銅[94]，銅還原後可以使腎調鈣素斷裂，因此斷裂的腎調鈣素失去了鈣的結合位置使得它失去了抑制草酸鈣晶體形成的能力，這使得結石的機會增加。銅離子過多產生結石的例子有威爾遜氏病[57]，所以除了維生素的安全劑量外，病人如果尿中有高量銅離子和原形的維生素 C，臨床上應該小心探討結石形成的可能。蛋白質與尿中成分的交互協同作用可能是抑制結晶形成的重要因素，結石核心中銅、鋅、和鐵的含量高過週邊的部分[77]，顯示二價離子參與結石的可能性。因此，草酸鈣晶體的形成被腎調鈣素、TH 蛋白和白蛋白抑制的現象，可能需要進一步加以研究，尤其是與金屬離子和維生素的交互作用，由此方向可更深入的探索結石的礦化機制。

腎小管受傷與結石形成的關係近幾年來也被廣泛的討論[74]，這個機轉在人體內不容易被研究，但是在細胞培養的實驗可獲得證實[142]。由我們實驗得知白蛋白可以防止自由基所帶來的傷害，從結果中可看出白蛋白比 TH 蛋白更有效的抑制自由基的產生，白蛋白抑制黃嘌呤氧化反應在 10.7 nM 時達到 50%，而 TH 蛋白需要七倍的濃度才行。酵素處理後的 TH 蛋白降低了抑制能力，顯示唾液酸也有抑制能力，因此 TH 蛋白的唾液酸在尿路系統內可能存在著某些功能，雖然 TH 蛋白是存在於細胞外液中，但是卻可以透過唾液酸和細胞膜交互作用，TH 蛋白可能因此能減少自由基對細胞膜的傷害。

蛋白質在與自由基反應後可能會形成離子聚集和厭水鍵[48]，白蛋白的對抗

自由基能力有可能是直接與其作用或螯合了氧化還原活躍的金屬離子如銅或鐵使自由基不反應[48]，這種抗氧化能力在我們的實驗中也得到相同的結果。由於自由基可以透過粒線體、溶 體和細胞膜的磷脂質過氧化來傷害細胞，改變了漿膜的結構和功能，THP 蛋白透過唾液酸與腎近端腎小管的細胞膜結合形成保護作用，所以 TP 蛋白也有抗氧化的能力。

整體而言，蛋白質抑制草酸鈣結晶形成的作用明顯，證明人類尿路結石很可能是屬於生物礦化的一種。目前雖然無法完全了解其機制，但是透過上述的實驗方式，可以測試很多種蛋白質的抑制作用，我們已完成結晶形成初期的完整實驗方法，在將來蛋白體學(Proteomics)上可以幫忙探討蛋白質的功能。

所有疾病都有遺傳相關的因素存在[84]，但是大多數的疾病是多因子疾病，這類疾病可能是一群基因些微的改變，並與環境因素互動所致。要找尋這些複雜疾病的基因群必須利用基因的多形性，傳統上的基因聯鎖分析來檢驗複雜疾病會因發病年齡較高使得取得診斷不易，或因太多基因座而受限[44]。基因多形性可以作為遺傳標記的選擇[18]，SNPs 標記符合了遺傳學研究方法的需求且方便、快速、經濟和精確，SNPs 的分析可以定出那段的基因可能與疾病連鎖[80]。尿路結石是複雜的多因子疾病，基因和環境因子或者是二者的互動都有可能參與其中，適合用此方法來研究。

如果某個因子會增加疾病的風險，這個因子在病人身上出現的頻率應該要比正常人高出很多，也就是基因型的關聯性[63]。基因多形性可提供病人產生某個疾病的風險性、幫助病人評估疾病的預後並選擇適當的藥物來治療[115]，這需要在大量的基因標記來檢定大數量的族群，才可以完成一個複雜疾病的檢測工作。我們採用此策略來探討結石病人和正常人隻間基因多形性的分布頻率，但是目前相關基因的報告很少，如何決定檢測那個基因是相當困難的工作，本實驗以文獻報告與結石相關和推定有關的基因，做為初步的選用基因。

維生素 D 受體基因多形性是第一個被報告與結石相關的基因[62]，維生素 D 受體在結合配位體 (ligand) 後活化，可以調控破骨激素的表現[9]，因此可能與

結石間質的形成有關[149]。然而維生素 D 受體不只是被上游的維生素 D 所調控，而且也被蛋白激酶 A、副甲狀腺激素及生長因子調控。維生素 D 受體也可下游調控蛋白激酶 C[72]，維生素 D 受體的功能顯現此基因與結石疾病不只限於鈣的調控機制，而且與信號傳遞有關。用限制性核酸內切酶 *Fok I* 來辨認維生素受體 D 基因開始碼區域多形性可以分辨出對照組與結石組之間單核苷酸多形性分布的差別，此段多形性中不可切的 C 鹼基對偶基因在結石組的比例較高，病人如果是 CC 或 CT 的基因型有較高的機會得到結石，由我們的實驗發現，維生素 D 受體基因的是可以作為多形性標記的。

Zerwekh 等人也曾研究維生素 D 受體對偶基因在正常人與結石病人分布的不同，但是並沒有發現突變[153]，他們把病人分成高鈣尿和正常尿鈣組在維生素 D 受體基因型間血清和尿液分布也沒有顯現差異。Zerwekh 並分析了插入序列七八之間 *Bsm I* 多形性與結石之間的關聯，也沒有發現差別，因此結論認為腸吸收型高尿鈣症雖然是常見的異常[111]，但可能是多源性的疾病而非單一的病因所致[120]。由我們資料顯示維生素 D 受體基因 *Bsm I* 多型性可能不適合做為篩選結石疾病的基因標記，結石病人和正常人的對偶基因頻率分布是非常相似。

Zerwekh 和 Ruggiero 等人在高尿鈣的病人研究也是相同的結果[120,153]，但是 Ruggiero 則報告在正常尿鈣的結石病人和正常人之間 b 對偶基因分布反而不同，所以把病人分成高尿鈣與正常尿鈣的分組是否合適須進一步探討。

雖然草酸鈣結石的病人中高尿鈣症的很多而且被認為是增加尿中過飽和的狀態使得結石形成，但是真正的高尿鈣症的病理機制仍然存疑，報告中的 *CLCN5* 基因或感鈣受體基因（calcium sensing receptor）突變雖與高尿鈣有關但並不是高尿鈣的常見病因[20,113,124]，唯一比較可能的高尿鈣症基因拼圖是腸吸收型的高尿鈣症，位於染色體第一條的 1q23.3-q24，但是此段區域仍有四百三十萬個鹼基長需要研究[116]，同時 80 to 90 % 的高尿症並沒有任何的症狀與結石形成[22]，對於高尿鈣症的結石病人限制鈣的攝取來預防復發，已經被證明是反效果[21]，限鈣可能造成骨質疏鬆和草酸吸收增加使得結石更容易產生[17]，因此草

酸鈣的結石是一個很複雜的疾病且並不能與限鈣治療完全相符合。

尿路結石是與結晶形成息息相關的，如前所述晶體與腎小管交互作用可能與結石形成有關，因此細胞死亡可能與結石形成有關[74,136]。雖然目前 p21 並無與結石的相關報告，但是 p21 受 p53 的調控而與細胞死亡息息相關[29,44]，因此被選為 SNPs 的標記。由我們的資料顯示 p21 基因第三十一密碼子多形性可能適合做為篩選草酸鈣結石病因的基因標記，精氨酸的對偶基因在對照組分布較多。

Urivetzky 提出以測量血清中的破骨激素濃度的方法來鑑別診斷鈣類結石病人的高尿鈣症患者[140]，Strohmaier 等人在一個破骨激素對限鈣飲食的臨床研究發現，對於高尿鈣的結石病人行限鈣飲食必須他的破鈣激素對限鈣飲食沒有反應才有效[130]，同時破鈣激素曾在結石間質中被找出來是主要的蛋白質成分[96, 149]，由於有機間質早就是被認定是在病理礦物沉積中影響結晶生長的主要物質[65]，顯示破骨激素與鈣類結石息息相關。同時，在尿路結石形成的機制理論中破骨激素分泌，隨後坎入結石間質之中，影響腎小管的晶體留存有關[85]。因此，被選為遺傳標記 SNPs 的研究基因，但是，我們的結果並沒有顯現破骨激素基因 *Hind III* 多形性適合做為草酸鈣結石的遺傳標記，病人與正常人之間其基因型分布並無統計學上的差異。

降血鈣素受體基因 *Alu I* 多形性對偶基因在台灣族群與義大利骨質疏鬆症的婦女之間是不同的[93]，在我們研究的對照組中並沒有白氨酸的基因型存在，但是在病人群白氨酸卻有 0.14 的對偶基因比例，顯示出有結石疾病的易感性。由 Nakamura 等人研究日本的族群發現[108]，最常見的基因型是脯氨酸的同源合子 (94/117) 且只有一個白氨酸的同源合子，這個報告跟我們的數據相接近。

我們的數據顯示降血鈣素受體基因 *Alu I* 多形性適合做為鈣類結石疾病的基因標記來篩選其關聯性，病人若有白氨酸的對偶基因有較高的結石得病率。雖然目前國外對於結石疾病的單核酸多形性研究集中於維生素 D 受體基因[62]，其他相關的基因亦可以做為探討的對象。降血鈣素受體基因 *Alu I* 多形性在此受體的

細胞內的功能領域段(intracellular domain 4)[108]，因為降血鈣素受體基因是賀爾蒙受體與 G 偶合蛋白相關，一個功能領域的輕微改變可以促使一連串反應而出現巨大改變，所以此段多形性被考慮有可能影響了細胞內的信號傳遞路徑，因而與某些疾病相關聯[108]。本研究顯示降血鈣素受體基因 *Alu I* 多形性與結石疾病是相關的。

降血鈣素抑制破骨後的鈣回收作用，經降血鈣素受體刺激尿鈣的分泌[6]，降血鈣素受體基因在腎小管上皮、睪丸、破骨細胞、腦及卵巢有表現[11,37,92,110]，此外，降血鈣素受體基因 *Alu I* 多形性位於細胞內的部分與腺酸環化、磷脂 C 相連接，調控了鈣的分泌和磷脂質的代謝[131,152]，而增加磷脂質的過氧化亦被提出可能與結石有關[136]，雖然這些機制仍有很多未清楚的地方，降血鈣素受體調控的信號傳遞路徑影響結石的相關性必須考慮。

白血球介素-1 受體拮抗基因是發炎的重要調控者，白血球介素-1 受體拮抗基因是白血球介素-1 的自然競爭抑制因子，佔據白血球介素-1 的細胞表面受體位置而不發動信號的傳遞[1]。白血球介素-1 受體拮抗基因的對偶基因型與很多自體免疫的疾病有關聯性，如簇狀禿髮、全身性紅斑狼瘡和潰瘍性大腸炎等[7,89,135]，但是在我們研究的資料內，白血球介素-1 受體拮抗基因的第二插入序列多形性第一型對偶基因(type I)確實影響了結石病的易感性，而我們的對偶基因分布也與法國的類風濕性關節炎病人不同[8]，不管是病人和對照組我們沒有第三、四和五型，而結石病人中並沒有第二型，因此白血球介素-1 受體拮抗基因與結石的關聯性可能和自體免疫疾病不同，甚至是經由一個比較複雜的方式。

細胞激素也可能與結石有關聯，但從未有基因多形性的研究報告，我們選用細胞激素做為候選的基因標記是因為這一群蛋白質與很多的疾病息息相關。由本研究顯示，白血球介素-1 受體拮抗基因與結石之間有相關性。白血球介素-1 受體拮抗基因是賀爾蒙受體與 G 蛋白偶合，因此這種輕微的改變可以使細胞內有所變化，進而使疾病產生[109]，因此其與結石疾病的關聯性可能經由此途徑。白血球介素-1 受體拮抗基因第二插入序列的多形性可以做為結石疾病的遺傳標

記，第一型可能與結石疾病相關性較高。

白血球介素-1 與很多的生物活性相關，如急性期的體溫增加、蛋白質的代謝和能量的消耗等反應[32]，但是我們並沒有找到它與結石疾病的相關性。我們的結果與 Langdahl 等人的發現是相類似的[76]，白血球介素-1 受體拮抗基因多形性與骨質疏鬆造成的骨折有關，第一型的有較高的危險性，但是白血球介素-1 beta 基因與骨質疏鬆骨質改變或轉換均無關聯性，這也有可能是選擇多形性的位置不恰當的緣故，或者是這個基因與結石關係較不顯著。由於白血球介素-1 基因位於第二染色體緊連著白血球介素-1 受體拮抗基因[127]，或者基因的連鎖不平衡(Linkage disequilibrium)也可能是其中的原因之一。

男性結石病患數目比女性多的原因並不很清楚，男性尿液中平均草酸濃度比女性高曾被報告可能相關[22,141]，男性病患與性賀爾蒙關聯性較高也是可能原因[78]，但確切原因不甚清楚。由於男性賀爾蒙的活性與雄性素受體相關，因此雄性素受體也有可能與結石的形成有關，本研究發現男性病患與雄性素受體基因有相關性，顯現與該假說符合。CAG 重複呈某一單峰特別高的分布，而 21-CAG 重複有較低的結石比率可能說明了此多形性能影響結石形成，反映出基因可能的作用。

本研究顯示雄性素受體基因多形性與女性結石病患沒有相關性，由於雄性素受體基因是位於 X 性染色體，在女性身上表現此基因可能比男性複雜，男性只有一條基因，很容易統計出來相關性；反之，女性由於有 X 染色體的隨機甲基化表現，其細胞內的對偶基因表現很難看出來，因此其功能很難計算出是由那條對偶基因所作用，而且女性的雄性素濃度相當低，所以女性病患看不出有相關性。

Yoshihara 等人研究老鼠甘醇酸鹽 (glycolate) 轉化成草酸的代謝有性別差異，甘醇酸鹽氧化 的活性會被睪丸酮提升[151]，同時也發現動情激素會降低雄性老鼠甘醇酸鹽氧化 的活性。在我們的研究中也發現，男性病患在雌性素受體基因多形性的 TA 重複分布與對照組是不同的，雖然在 14 重複的單峰沒有差

異，此多形性仍可考慮與男性結石病患是有相關性。女性病患因為有週期性的高低性激素的變化，一般體細胞可能較男性體細胞能忍受其改變，腎臟細胞內的雌性素受體可能因此對性腺激素的作用反應較低，這可能是女性病患沒有與此基因多形性相關連的原因，況且女性賀爾蒙可以抑制晶體聚集，和抑制實驗老鼠 osteopontin 的表現[151]，更加說明了女性病患與此基因多形性無關。

由本研究得知結石疾病與基因多形性相關，但是我們的工作仍很初步，因為相關的研究報告太少，所以檢測的基因仍嫌不足，相關的基因仍待繼續探索。基因多形性可能是直接引起疾病、天擇的結果、族群採樣階層化、統計上的誤差、或是基因的連鎖不平衡的結果[129]，因此我們將來必須謹慎的採樣病人群、收集足夠的數量、並小心的把病人臨床診斷分型，以便分析。相關基因功能性的分析可以幫忙釐清這些基因在疾病發生中所扮演的角色[63]，因此，在找出基因的關聯後，應該進行此項研究以便能有深入的突破。

由於缺乏一個可靠的預測標記，結石病人通常在症狀產生以後才被診斷出來，因此，想要早期診斷及早期治療結石必須要有一群可靠的標記可以運用，如此才可以改善病人的健康情形及預防疾病的發生，並減少醫療的支出和浪費。我們期望逐次增加一些適合的遺傳標記，加上一些環境因子與基因的相關性的探討，除了診斷外，可以找出相關的危險因子與基因互動的關係，還可以使基因體學運用於結石這個疾病的防治工作上。

第六章、結論

尿路結石是一個複雜且多因子的疾病，從我們的實驗中可以得知，生物分子可以影響結晶的形成，這些生物分子可以透過不同的途徑去參與結石的生物礦化的過程，它可能扮演著抑制因子的角色，也有可能是經由其他複雜的生物活性的方式去影響結晶的形成，如自由基的作用等。結晶的生物化學進展，可以應用於將來的蛋白質體學(proteomics)，若能發現新的蛋白質參與了結晶的形成，必然可以運用我們的方法，去探討新蛋白質在結晶形成時所扮演的角色。

生命科學可以從不同的角度切入，如從生物化學的方向、細胞生物學以及分子生物學的方向等，除了從生物化學的方向外，我們也嘗試從分子遺傳學的方向去探索結石形成的機制，本實驗共探討了十一個可能的遺傳基因標記來了解與結石的關聯性，其中維生素 D 的開始碼多形性、降血鈣素受體多形性、p21 第 31 個密碼子多形性、白血球介素-1 受體拮抗基因、雄性素受體與雌性素受體等基因均有其關聯性。由於核酸多形性是廣泛的基因體學研究，目前所篩選的基因仍是不足以構成連鎖，因此，將來必須篩選更多的合適基因、臨床檢測基因以確定其關聯性、以數學運算的方式來定訂其預測結石病的準確度、描繪其可能的基因連鎖圖，進而找出一個或多個真正是結石疾病的致病基因。若能有所發現，可將這些基因在細胞內表現，以生物化學的方式探討其可能的作用機制，進一步深入了解其複雜的生物作用。如此就可能研發出預防結石形成的治療藥物或方法，以治療廣大的結石病人。

第七章、表格

表一、THP 蛋白與白蛋白在自然與經酵素處理的狀態下改變 2.5% 對照組光學吸收強度所需的時間(T_i , 秒)。

	10 nM	50 nM	100 nM	500 nM	1000 nM
THP					
Native	64.64±12.68*	52.89±8.25*	41.53±11.81**	28.60±13.68**	15.4±10.05**
D-NANA	56.38±18.15*	53.27±7.25*	44.16±3.91*	37.98±16.89**	33.29±9.57**
Albumin					
Native	80.7±3.54	37.59±4.75*	37.56±15.2**	29.85±3.18**	7.48±1.23**
D-NANA	71.63±20.91	42.3±2.73*	41.52±7.60*	38.2±11.87**	37.8±6.97**

D-NANA: 經唾液酸 處理的蛋白質

數據是以平均值 ± 標準差來表示，代表了三次實驗的結果。

● * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

動力學參數是誘導時間，以 t_i 表示，代表從加入草酸開始至可以測量到的時間；亦即 OD 值改變 0.005 單位（最大 OD 值的 2.5%），對照組 OD 值是 0.00142，時間是 83.81 秒。

表二、THP 蛋白和白蛋白抑制晶體聚集的百分比。

	10 nM	50 nM	100 nM	500 nM	1000 nM
THP					
Native	63.64±11.44**	81.82±5.45**	81.82±8.18**	72.73±11.74**	-54. ±4.45**
D-NANA	36.36±21.64**	54.55±4.55**	-54.55±4.45**	-54.55±4.45**	
Albumin					
Native	36.36±10.50**	45.45±7.42**	72.73±8.70**	72.73±4.55**	72.73±5.25**
D-NANA	18.18±18.74	36.36±5.25**	45.45±4.55**	72.73±8.70**	72.73±5.24**

數據是以平均值 ± 標準差來表示，代表了三次實驗的結果。

抑制的程度是以抑制百分比來表示。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

THP 蛋白在濃度超過 500 nM 後因為自我聚集，使實驗無法再測量。

表三、腎調鈣素的晶體成長抑制 IC₅₀。

	10 nM	20 nM	50 nM	100 nM	IC ₅₀
Nakagawa' s report	16%		18%	24%	*393.29 nM
Present work	3.0%	6.0%	10.0%	18.2%	**284.6 nM

* Y= 0.0902X+14.5250 , **Y=0.1692X+1.8637

表四、黃 吟-黃 氧化 反應的抑制實驗，THP 蛋白和白蛋白各以自然狀態和經酵素處理來參與反應，數據以抑制百分比%(平均值±標準差)來表達，比較則以 50 %抑制濃度 (IC₅₀)為之。

	10 nM	20 nM	50 nM	100 nM	IC ₅₀
THP					
Native	7.7±2.7	7.7±24.7	15.4±5.4	79.5±8.8*	69.6 nM
Deglycosylated	-6.7±11.4	-2.2±17.6	30.7±8.6**	38.6±10.1*	102.0 nM
Albumin	1 nM	2 nM	5 nM	10 nM	
Native	23.07±21.2	33.1±29.1	40.8±29.1	46.27±7.7	10.7 nM
Deglycosylated	-6.8±11.4	9.1±13.4	17.0±4.4*	40.31±17.0*	11.9 nM

Student-t test , * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

表五、降血鈣素受體基因 *Alu* I 多形性，

各種基因型發生的頻率，統計方法是以 Fisher's exact test 來做。

	CC	CT	TT	Total	<i>p</i> -value
對照組	99 (94.3%)	6 (5.7%)	0 (0.0%)	105 (100.0%)	0.0002
結石病人	75 (73.5%)	25 (24.5%)	2 (2.0%)	102 (100.0%)	

表六、降血鈣素受體基因 *Alu* I 多形性，各種基因型在男性發生的頻率，統計方

法是以 Fisher's exact test 來做。

	CC	CT	TT	Total	<i>p</i> -value
對照組	60 (100.0%)	0 (5.7%)	0 (0.0%)	60 (100.0%)	0.0001
結石病人	56 (73.7%)	18 (23.7%)	2 (2.6%)	76 (100.0%)	

表七、降血鈣素受體基因 *Alu* I 多形性，各種基因型在女性發生的頻率，統計方

法是以 Fisher's exact test 來做。

	CC	CT	TT	Total	<i>p</i> -value
對照組	39 (86.7%)	6 (13.3%)	0 (0.0%)	45 (100.0%)	0.205
結石病人	19 (73.1%)	7 (26.9%)	0 (0.0%)	26 (100.0%)	

表八、破骨激素基因 *Hind* III 多形性的基

因型分布頻率，統計是以卡方試驗計算。

	TT	TC	CC	Total	<i>p</i> -value
對照組	45	48	12	105	0.978
	(42.9%)	(45.7%)	(11.4%)	(100.0%)	
結石病人	4	48	11	102	
	(42.2%)	(47.1%)	(10.8%)	(100.0%)	

表九、破骨激素基因 *Hind* III 多形性基因型在女性族群的分布頻率，統計是以費雪氏精確試驗計算。

	TT	TC	CC	Total	<i>p</i> -value
對照組	20 (44.4%)	22 (48.9%)	3 (6.7%)	45 (100.0%)	
結石病人	13 (50.0%)	12 (46.2%)	1 (3.8%)	26 (100.0%)	0.925

表十、破骨激素基因 *Hind* III 多形性基因型在男性族群的分布頻率，統計是以卡方試驗計算。

	TT	TC	CC	Total	²	<i>p</i> -value
對照組	25 (41.7%)	26 (43.3%)	9 (15.0%)	60 (100.0%)		
結石病人	30 (39.5%)	36 (47.4%)	10 (13.1%)	76 (100.0%)	0.241	0.886

表十一、p21 基因第 31 密碼子多形性在正常對照組與結石病人的分布

	CC	C/A	AA	Total	<i>p</i> -value
對照組	21 (17.6%)	60 (50.4%)	38 (31.9%)	119 (100.0%)	0.03701
結石病人	18 (18.9%)	61 (64.2%)	16 (16.8%)	95 (100.0%)	

卡方試驗，df=2, $\chi^2=6.59334$

表十二、p21 基因第 31 密碼子多形性在女性正常對照組與結石病人的分布

	CC	C/A	AA	Total	<i>p</i> -value
對照組	13 (16.9%)	40 (51.9%)	24 (31.2%)	77 (100.0%)	0.754
結石病人	4 (16.0%)	15 (60.0%)	6 (24.0%)	25 (100.0%)	

卡方試驗，df=2, $\chi^2=0.56$

表十三、p21 基因第 31 密碼子多形性在男性正常對照組與結石病人的分布

	CC	C/A	AA	Total	<i>p</i> -value
對照組	8 (19.0%)	20 (47.6%)	14 (33.3%)	42 (100.0%)	0.052
結石病人	14 (20.0%)	46 (65.7%)	10 (14.3%)	70 (100.0%)	

卡方試驗，df=2, $\chi^2=5.92$ ，* $p<0.05$

表十四、維生素 D 受體基因 *Fok I* 多形性在對照組與草酸鈣結石病人之間的分布

	CC	CT	TT	Total	<i>p</i> -value
對照組	21 (23.3%)	43 (47.8%)	26 (28.9%)	90 (100.0%)	0.0321*
結石病人	54 (37.0%)	67 (45.9%)	25 (17.1%)	146 (100.0%)	

卡方試驗， $\chi^2=6.875$, df=2

表十五、維生素 D 受體基因 *Bsm* I 多形在對照組與結石病人的分布

	BB	Bb	bb	Total	<i>p</i> -value
對照組	78 (86.6%)	9 (10.0%)	3 (3.3%)	90 (100.0%)	0.891
結石病人	110 (88.7%)	10 (8.1%)	4 (3.2%)	124 (100.0%)	

費雪氏精確試驗

表十六、白血球介素一 基因第五表現序列多形性在對照組與結石病人的基因型分布

	E1/E1	E1/E2	E2/E2	Total	<i>p</i> -value
對照組	102 (97.14%)	3 (2.86%)	0 (0.0%)	105 (100.00%)	0.403
結石病人 t	149 (98.68%)	2 (1.32%)	0 (0.0%)	151 (100.00%)	

費雪氏精確檢驗

表十七、白血球介素一 基因啟動子區域多形性在對照組與結石病人的基因型分布

	C/C	C/T	T/T	Total	<i>p</i> -value
--	-----	-----	-----	-------	-----------------

Control	28	50	27	105	0.627
	(26.67%)	(47.62%)	(25.71%)	(100.00%)	
Stone patient	49	66	37	152	
	(32.24%)	(43.42%)	(24.34%)	(100.00%)	

卡方試驗，df=2, $\chi^2=0.933$.

表十八、白血球介素一拮抗基因多形性在對照組與結石病人的基因型分布

	I	I&II	II	Total	<i>p</i> -value
對照組	92 (89.32%)	10 (9.70%)	1 (0.97%)	103 (100.00%)	0.005*
結石病人	145 (97.97%)	3 (2.02%)	0 (0.0%)	148 (100.00%)	

費雪氏精確檢驗，* $p < 0.01$ 。

表十九、雄性素受體 CAG 重複多形性在男性病患和對照組的病人數，分組為 21 重複與非 21 重複。

	21-repeat	Non-21 repeat	Total	<i>p</i> value
對照組	20 (37.0 %)	34 (63.0 %)	54 (100.0%)	0.005*
結石病人	17 (16.2 %)	88 (83.8 %)	105 (100.0%)	

卡方試驗, $\chi^2=8.679$, 自由度=1 , * $p < 0.05$

表二十、雄性素受體 CAG 重複多形性在女性病患和對照組的病人數，分組為 21 重複與非 21 重複。

	21-repeat	Non-21 repeat	Total	<i>p</i> value
對照組	10 (23.8 %)	32 (76.2 %)	42 (100.0%)	0.202
結石病人	12 (37.5 %)	20 (62.5 %)	32 (100.0%)	

卡方試驗， $\chi^2=1.629$ ， $p>0.05$

表二十一、雌雄性素受體 TA 重複多形性在男性病患和對照組的病人數，分組為 14 重複與非 14 重複。

	14-repeat	Non-14 repeat	Total	<i>p</i> value
對照組	20 (35.1 %)	37 (64.9 %)	57 (100.0%)	0.491
結石病人	35 (29.9 %)	82 (70.1 %)	117 (100.0%)	

卡方試驗， $\chi^2=0.474$ ， $p>0.05$

表二十二、雌雄性素受體 TA 重複多形性在女性病患和對照組的病人數，分組為 14 重複與非 14 重複。

	14-repeat	Non-14 repeat	Total	<i>p</i> value
對照組	19 (42.2 %)	26 (57.8 %)	45 (100.0%)	0.980
結石病人	13 (41.9 %)	18 (58.1 %)	31 (100.0%)	

卡方試驗， $\chi^2=0.000$ ， $p>0.05$

表二十三、基因多形性的結果摘要

基因名	多形性位置	染色體位置	關聯性	OR	95% CI
維生素 D 受體	第八插入序列	12q12-q14	No		
維生素 D 受體	開始密碼子	12q12-q14	C allele	1.67	1.15~2.43
降血鈣素受體	第 1377 核酸	7q21.3	T allele (leucine)	5.63	2.28~13.88
p21 基因	31 密碼子	6q21.2	C allele (serine)	1.39	0.94~2.04
破骨素	第一表現序列 198 bp 之上游啟動子	1q25-q31	No		
白血球介素 $I\beta$	啟動子	2q14	No		
白血球介素 $I\beta$	第五插入序列	2q14	No		
白血球介素 I 受體拮抗蛋白	第二插入序列	2q14.2	I allele	6.04	1.68~21.69
雄性素受體	第一表現序列	Xq11-q12	M: Yes		
雌性素受體	基因 1174bp 上游	6q25.1	F: No		

第八章、參考文獻

1. Arend W (1991) Interleukin 1 receptor antagonist: a new member of the interleukin 1 family. *J Clin Invest* 88:1445-51.
2. Asplin JR, Bushinsky DA, Singharetnam W, Riordon D, Parks JH, Coe FL (1997) Relationship between supersaturation and crystal inhibition in hypercalciuric rats. *Kid Int* 51:640-5.
3. Atkins GL, Dean BM, Griffin WJ, Watts RWE (1964) Quantitative aspects of ascorbic acid metabolism in man. *J Biol Chem* 239:2975-80.
4. Bahl R, Arora S, Nath N, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R (2000) Novel polymorphism in p21 waf1/cip1 cyclin dependent kinase inhibitor gene: association with human esophageal cancer. *Oncogene* 19:323-8.
5. Bijovet OLM, Van der Sluys Veer J, De Vries HR, Van Koppen ATJ (1971) Natriuretic effect of calcitonin in man. *N Eng J Med* 284:681-8.
6. Biri H, Ozturk HS, Buyukkocak S, Kacmaz M, Burak Cimen MY, Unal D, Birey M, Bozkirli I, Durak I (1998) Antioxidant defense potential of rabbit renal tissue after ESWL: Protective effects of antioxidant vitamins. *Nephron* 79:181-5.
7. Blakemore AI, Tarlow JK, Cork MJ, Gordon C, Emery P, Duff GW (1994) Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism as a disease severity factor in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 37:1380-5.
8. Cantagrel A, Navaux F, Loubet-Lescoulie P, Nourhashemi F, Enault G, Abbal M, Constantin A, Laroche M, Mazieres B (1999) Interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: Relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 42:1093-2000.
9. Celeste AJ, Rosen V, Buecker JL, Kriz R, Wang EA, Wozney JM (1986) Isolation of the human gene for bone gla protein utilizing mouse and rat cDNA

- clones. *EMBO J* 5:1885-90.
10. Cerini C, Geider S, Dussol B, Hennequin C, Daudon M, Veessler S, Nitsche S, Boistelle R, Berthezene P, Dupuy P, Vazi A, Berland Y, Dagorn JC, Verdier JM (1999) Nucleation of calcium oxalate crystals by albumin: Involvement in the prevention of stone formation. *Kid Int* 55:1776-86.
 11. Chausmer Stuart C, Stevens M (1980) Identification of testicular cell plasma membrane receptors for calcitonin. *J Lab Clin Med* 96:933-8.
 12. Chen WC, LuHF, Wu HC, Lee T, Lee CW (1999) Aspects of urolithiasis in Mid-Taiwan by 1095 stone analysis by infrared spectroscopy. *In* :Borghi L, Meschi T, Briganti A, Schianchi T, Novarini A eds: *Kidney stones*. Cosenza Italy, Editoriale Bios, p135-7.
 13. Chang WS, Lee YJ, Lu FJ, Chiang HC (1993) Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Res* 13:2165-70.
 14. Coe FL, Parks JH, Asplin JR (1992) The pathogenesis and treatment of kidney stones. *New Eng J Med* 327:1141-52.
 15. Coe FL, Nakagawa Y, Asplin J, Parks JH (1994) Role of nephrocalcin in inhibition of calcium oxalate crystallization and nephrolithiasis. *Miner Electrolyte Metab* 20:378-84.
 16. Coe FL, Favus MJ, Pak CYC, Parks JH, Preminger GM (1996) *Kidney stones: medical and surgical management*. Lippincott-Raven, Philadelphia.
 17. Coe FL, Parks JH, Favus MJ (1997) Diet and calcium; the end of an era? *Ann Int Med* 126:553-5.
 18. Collins FS, Guyer MS, Chakravarti A (1997) Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. *Science* 278:1580-1.
 19. Copeland RA (1993) *Methods for protein analysis*. Chapman & Hall, New York, pp45-46.

20. Cramer SD, Ferree PM, Lin K, Milliner DS, Holmes (1999) The gene encoding hydroxypyruvate reductase (GRHPR) is mutated in patients with primary hyperoxaluria type II. *Hum Mole Genet* 8:2063-9.
21. Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ (1993) A prospective study of dietary calcium and other nutrients and the risk of symptomatic kidney stones. *N Eng J Med* 328:833-38.
22. Curhan GC (1999) Epidemiologic evidence for the role of oxalate in idiopathic nephrolithiasis. *J Endourol* 13:629-31.
23. Curhan GC, Willett WC, Speizer FE, Stampfer MJ (1999) Intake of vitamins B6 and C and the risk of kidney stones in women. *J Am Soc Nephrol* 10:840-5.
24. Danpure CJ (2000) Genetic disorders and urolithiasis. *Urol Clin N Am* 27:287-99.
25. Dohi Y, Iki M, Ohgushi H, Gojo S, Tabata S, Kajita E, Nishino H, Yonemasu K (1998) A novel polymorphism in the promoter region for the human osteocalcin gene: The possibility of a correlation with bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *J Bone Miner Res* 13:1633-9.
26. Dretler SP, Coggins CH, Melder MA, Their SO (1969) The physiologic approach to renal tubular acidosis. *J Urol* 102:665-9.
27. Dussol B, Geider S, Lilova A, Leonetti F, Dupuy P, Daudon M, Berland Y, Dagorn JC, Verdier JM (1993) Analysis of the soluble organic matrix of five different kidney stones: Evidence for a specific role of albumin in the constitution of the stone protein matrix. *Urol Res* 23:45-51.
28. Edwards A, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Chakraborty R (1992) Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics* 12:241-53
29. Edyvane KA, Hibberd CM, Harnet RM, Marshall VR, Ryall RL (1987)

Macromolecules inhibit calcium oxalate crystal growth and aggregation in whole human urine. Clin Chim Acta 167:329-38.

30. el-Deiry WS, Tokino T, Waldman T, Oliner JD, Velculescu VE, Burrell M, Hill DE, Healy E, Rees JL, Hamilton SR (1995) Topological control of p21WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues. Cancer Res 55:2910-9.
31. Era S, Kuwata K, Imai H, Nakamura K, Hayashi T, Sogami M (1995) Age-related change in redox state of human serum albumin. Biochim Biophys Acta 1247:12-6.
32. Fearon DT, Locksley RM (1996) The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. Science 272:50-4.
33. Ferrari S, Rizzoli R, Chevalley T, Slosman D, Eisman JA, Bonjour JP (1995) Vitamin D receptor gene polymorphisms and change in lumbar spine bone mineral density. Lancet 345:423-4.
34. Finlayson B, Reid F (1978) The expectation of free and fixed particles in urinary stone disease. Invest Urol 15:442-8.
35. Fleet JC, Harris SS, Wood RJ, Dawson-Hughes B (1995) The *Bsm* I vitamin D receptor restriction fragment length polymorphism (BB) predicts low bone density in premenopausal black and white women. J Bone Miner Res 10:985-90.
36. Garnero P, Borel O, Sornay-Rendu E, Delmas PD (1995) Vitamin D receptor gene polymorphisms do not predict bone turnover and bone mass in healthy premenopausal black and white women. J Bone Miner Res 10:1283-8.
37. Goltzman D (1985) Interaction of calcitonin and calcitonin gene-related peptide at receptor sites in target tissues. Science 227:1343-5.
38. Goodman HO, Brommage R, Assimos DG, Holmes RP (1997) Genes in idiopathic calcium oxalate stone disease. World J Urol 15:186-94.

39. Goran AH, Lin HY, Yamin M, Auron PE, Flannery MR, Tapp DR, Manning CA, Lordish HF, Krane SM, Goldring SR (1992) Cloning, characterization, and expression of a human calcitonin receptor from an ovarian carcinoma cell line. *J Clin Invest* 90:1726-35.
40. Grases F, Garcia-Ferragui L, Costa-Bauza A (1998) Development of calcium oxalate crystals on urothelium: Effect of free radicals. *Nephron* 78:296–301.
41. Gressner AM and Henn KH (1985) Evaluation of a fully mechanized enzymatic kinetic determination of sialic acid. *J Clin Chem Clin Biochem* 23:781-5.
42. Gross C, Eccleshall TR, Malloy PJ, Villa ML, Marcus R, Feldman D (1996) The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *J Bone Miner Res* 11:1850-5.
43. Grover PK, Ryall RL, and Marshall VR (1990) Does Tamm-Horsfall mucoprotein inhibit or promote calcium oxalate crystallization in human urine? *Clinica Chimica Acta* 190:223-34.
44. Grover PK, Moritz RL, Simpson RJ, Ryall RL (1998) Inhibition of growth and aggregation of calcium oxalate crystals in vitro. A comparison of four human proteins. *Eu J Biochem* 253:637–44.
45. Gujuluva CN, Baek JH, Shin KH, Cherrick HM, Park NH (1994) Effect of UV-irradiation on cell cycle, viability and the expression of p53, gadd153 and gadd45 genes in normal and HPV-immortalized human oral keratinocytes. *Oncogene* 9:1819-27.
46. Gupta C (2000) The role of estrogen receptor, androgen receptor and growth factors in diethylstilbestrol-induced programming of prostate differentiation. *Urol Res* 28:223-9.

47. Hakimi JM, Schoenberg MP, Rondinelli RH, Piantadosi S, Barrack ER (1997) Androgen receptor variants with short glutamine or glycine repeats may identify unique subpopulations of men with prostate cancer. *Clin Cancer Res* 3:1599-608.
48. Halliwell B, Gutteridge JMC (1990) The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 280:1-8.
49. Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed, London, Oxford, p23.
50. Hallson PC, Choong SKS, Kasidas GP, Samuell CT (1997) Effects of Tamm-Horsfall protein with normal and reduced sialic acid content upon the crystallization of calcium phosphate and calcium oxalate in human urine. *Br J Urol* 80:533-8.
51. Harris SS, Eccleshall R, Gross C, Dawson-Hughes B, Feldman D (1997) The vitamin D receptor start codon polymorphism (Fok I) and bone mineral density in premenopausal American black and white women. *J Bone Miner Res* 12:1043-8.
52. Hess B, Nakagawa Y, Parks JH, Coe FL (1991) Molecular abnormality of Tamm-Horsfall glycoprotein in calcium oxalate nephrolithiasis. *Am. J. Physiol.* 260:F569-F578.
53. Hess B, Meinhardt U, Zipperle L, Giovanoli R, Jaeger P (1995) Simultaneous measurements of calcium oxalate crystal nucleation and aggregation: impact of various modifiers. *Urol Res* 21:231-8.
54. Hession C, Decker JM, Sherblom A, Kumar S, Mattaliano R, Tizard R, Kawashima E, Schmeissner U, Heletky S, Chow P, Burne C, Shaw A, Muchmore A (1987) Uromodulin (Tamm Horsfall glycoprotein): A renal ligand for lymphokines. *Science* 237:1479-84.
55. Hodgkinson A, Pyrah LN (1958) The urinary excretion of calcium and inorganic phosphate in 344 patients with calcium stones of renal origin. *Br J Surg*

46:10-8.

56. Hofbauer J, Fang-Kircher S, Steiner G, Wiener H, Susani M, Simak R, Ghoneim MA, Marberger M (1998) N-acetylneuraminic acids (nana): a potential key role in renal calculogenesis. *Urol Res* 26:49-56.
57. Hoppe B, Neuhauser T, Superti-Furga A, Forster I, Leumann E (1993) Hypercalciuria and nephrocalcinosis, a feature of Wilson's disease. *Nephron* 65:460-2.
58. Hsu CY, Li CW (1994) Magnetoreception in honeybees. *Science* 265:95-7.
59. Hunt JS, McGiver AR, Groufsky A, Lynn KL, Taylor MC (1985) Affinity-purified antibodies of defined specificity for use in a solid-phase microplate radioimmunoassay of human Tamm-Horsfall glycoprotein in urine. *Biochem J* 227:957-63.
60. Hustmyer FG, Peacock M, Hui S, Johnston CC, Christian J (1994) Bone mineral density in relation to polymorphism at vitamin D receptor gene locus. *J Clin Invest* 94:2130-4.
61. Ingles SA, Ross RK, Yu MC, Irvine RA, La Pera G, Haile RW, Coetzee GA (1997) Association of prostate cancer risk with genetic polymorphisms in vitamin D receptor and androgen receptor. *H Natl Cancer Inst* 89:166-70.
62. Jackman SV, Kibel AS, Ovuworie CA, Moore RG, Kavoussi LR, Jarrett TW (1999) Familial calcium stone disease: Taq I polymorphism and the vitamin D receptor. *J Endourol* 13:313-6.
63. Johnson GCL, Todd JA (2000) Strategies in complex disease mapping. *Current Opin in Genet & Development* 10:330-4.
64. Katholi RE, Thomas Woods Jr WT, Taylor GJ, Deitrick C, Womack KA, Katholi CR, McCann WP (1998) Oxygen free radicals and contrast nephropathy. *Am J Kid Dis* 32:64-71.

65. Khan SR, Hackett RL (1993) Role of organic matrix in urinary stone formation: An ultrastructural study of crystal matrix interface of calcium oxalate monohydrate stones. *J Urol* 150:239-45.
66. Khan SR (1995) Calcium oxalate in biological systems. CRC Press, Boca Raton.
67. Knorle R, Schnierle P, Koch A, Buchholz NP, Hering F, Seiler H, Ackermann T, Rutishauser G (1994) Tamm-Horsfall glycoprotein: role of inhibition and promotion of renal calcium oxalate stone formation studied with Fourier-transform infrared spectroscopy. *Clin Chem* 40:1739-43.
68. Kok DJ, Papapoulos SE, Blomen LJM, Bijvoet OLM (1988) Modulation of calcium oxalate monohydrate crystallization kinetics in vitro. *Kid Int* 34:346-50.
69. Kok DJ (1997) Intratubular crystallization events. *World J Urol* 15:219-28.
70. Koopmann J, Maintz D, Schild S, Schramm J, Louis DN, Wiestler OD, von Deimling A (1995) Multiple polymorphisms, but no mutations, in the WAF1/CIP1 gene in human brain tumors. *Br J Cancer* 72:1230-3.
71. Krall EA, Parry P, Lichter JB, Dawson-Hughes B (1995) Vitamin D receptor alleles and rates of bone loss: influences of years since the menopause and calcium intake. *J Bone Miner Res* 10:978-84.
72. Krishnan AV, Feldman D (1991) Activation of protein kinase C inhibits vitamin D receptor gene expression. *Mol Endocrinol* 5:605-12.
73. Kumar S, Muchmore A (1990) Tamm-Horsfall protein – uromodulin (1950-1990). *Kid Int* 37:1395-401.
74. Kumar S, Sigmon D, Miller T, Carpenter B, Khan SR, Malhotra R, Scheid C, Menon M (1991) A new model nephrolithiasis involving tubular dysfunction injury. *J Urol* 146:1384-9.
75. Kwok PY, Gu Z (1999) Single nucleotide polymorphism libraries: why and

how are we building them? *Molecular Medicine Today* 5:538-43.

76. Langdahl BL, Lokke E, Carstens M, Stenkjaer LL, Eriksen EF (2000)
Osteoporotic fractures are associated with an 86-base pair repeat polymorphism in the interleukin-1--receptor antagonist gene but not with polymorphisms in the interleukin-1beta gene. *J Bone Miner Res* 15:402-14.
77. Lanzalaco AC, Singh RP, Smesko SA, Nancollas GH, Sufrin G, Binette M, Binette JP (1988) The influence of urinary macromolecules on calcium oxalate crystal growth. *J Urol* 139:190-5.
78. Lee YH, Huang WC, Chiang H, Chen MT, Huang JK, Chang LS (1992)
Determination role of testosterone in the pathogenesis of urolithiasis in rats. *J Urol* 147:1134-8.
79. Lee YH, Huang WC, Huang JK, Chang LS (1996) Testosterone enhances whereas estrogen inhibit calcium oxalate stone formation in ethylene glycol treated rats. *J Urol* 156:502-5.
80. Li CW, Chu S, Lee M (1989) Characterizing the silica deposition vesicle of diatoms. *Protoplasma* 151:158-63.
81. Li YJ, Laurent-Puig P, Salmon RJ, Thomas G, Hamelin R (1995)
Polymorphisms and probable lack of mutation in the WAF1-CIP1 gene in colorectal cancer. *Oncogene* 10:599-601.
82. Lian JB, Stewart C, Puchacz E, Mackowiak S, Shalhoub V, Collart D, Zambetti G, Stein G (1989) Structure of the rat osteocalcin gene and regulation of vitamin D-dependent expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:1143-7.
83. Lin HY, Harris TL, Flannery MS, Aruffo A, Kaji HE, Gorn A, Kolakowski LF, Lordish HF, Golding SR (1991) Expression cloning of an adenylylate cyclase-coupled calcitonin receptor. *Science* 254:1022-4.
84. Lisa M (1999) From DNA to drugs. *Mol Med Today* 5:468-9.

85. Lord N (1999) Genetic variations can point the way to disease gene. *Nature* 401:734.
86. Lowenstam HA, Weiner S (1989) *On biomineralization*. Oxford University Press, New York.
87. Lu HF, Chen JH, Chen WC, Shen WC (1999) Vesicle calculus caused by migrant intrauterine device. *AJR* 173:505.
88. Lu HK, Huang CM, Li CW (1995) Translocation of ferritin and biomineralization of goethite in the radula of the limpet *Cellana toreuma* reeve. *Exp Cell Res* 219:137-45.
89. Mansfield JC, Holden H, Tarlow JK, di Giovine FS, McDowell TL, Wilson AG, Holdsworth CD, Duff GW (1994) Novel genetic association between ulcerative colitis and the anti-inflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist. *Gastroenterology* 106:637-42.
90. Mann S, Webb J, Williams RJP (1989) *Biomineralization; chemical and biochemical perspectives*. VCH publishers, New York.
91. Marth GT, Korf I, Yandell MD, Yeh RT, Gu Z, Zakeri H, Stitzel NO, Hillier LD, Kwok PY, Gish WR (1999) A general approach to single-nucleotide polymorphism discovery. *Nat Genet* 23:452-6.
92. Marx SJ, Woodward CJ, Aurbach GD, Glassman H, Keutmann HJ (1973) Renal receptors for calcitonin receptor: binding and degradation of hormone. *J Biol Chem* 248:4797-802.
93. Masi L, Becherini L, Gennari L, Colli E, Mansani R, Falchetti A, Cepollaro C, Gonnelli S, Tanini A, Brandi ML (1998) Allelic variants of human calcitonin receptor: Distribution and association with bone mass in postmenopausal Italian women. *Biochem Biophys Res Comm* 245:622-6.
94. Mathews CK, Van Holde KE (1996) *Biological oxidations, electron transport*

- and oxidative phosphorylation. In: Methews CK, Van Holde eds: Biochemistry. 2nd ed. Benjamin/Cummings, California. p551.
95. McGeown MG (1968) Inheritance of calcium renal stones. *Lancet* 7547:866.
 96. McKee MD, Nanci A, Khan SR (1995) Ultrastructural immunodetection of osetopontin and osteocalcin as major matrix components of renal calculi. *J Bone & Mineral Res* 10:1913-29.
 97. Meyer JL, Thomas Jr. WC (1982) Trace metal-citric acid complexes as inhibitors of calcification and crystal growth. II. Effects of Fe(III), Cr(III) and Al(III) complexes on calcium oxalate crystal growth. *J Urol* 128:1376-8.
 98. Mitsumori K, Terai A, Oka H, Segawa T, Ogura K, Yoshida O, Ogawa O (1999) Androgen receptor CAG repeat length polymorphism in benign prostatic hyperplasia (BPH): correlation with adenoma growth. *Prostate* 41:253-7.
 99. Morgan TR., Laudone VP, Heston WD, Zeitz L, Fair WR (1988) Free radical production by high energy shock waves: Comparison with ionizing irradiation. *J Urol* 139:186-9.
 100. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyer TV, Sambrook PN, Eisman JA (1994) Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 367:284-7.
 101. Muchmore A, Decker J (1987) Evidence that recombinant IL-1 exhibits lectin-like specificity and binds to homogenous uromodulin via N-linked oligosaccharides. *J Immunol* 138:2541-6.
 102. Mustafi D, Nakagawa Y (1996) Characterization of Ca²⁺-binding sites in the kidney stone inhibitor glycoprotein nephrocalcin using vanadyl ions: Different metal binding properties in strong and weak inhibitor proteins revealed by EPR and ENDOR. *Biochemistry* 35:14703-9.
 103. Nakagawa Y, Margolis HC, Yokoyama S, Kezdy FJ, Kaiser ET, Coe FL (1981)

- Purification and characterization of a calcium oxalate monohydrate crystal growth inhibitor from human kidney tissue culture medium. *J Biol Chem* 256:3936-44.
104. Nakagawa Y, Abram V, Kezdy FJ, Kaiser ET, Coe FL (1983) Purification and characterization of the principal inhibitor of calcium oxalate monohydrate crystal growth in human urine. *J Biol Chem* 258:12594-600.
105. Nakagawa Y, Ahmed MA, Hall SL, Deganello S, Coe FL (1987) Isolation from human calcium oxalate renal stones of nephrocalcin, a glycoprotein inhibitor of calcium oxalate crystal growth. Evidence that nephrocalcin from patients with calcium oxalate nephrolithiasis is deficient in γ -carboxyglutamic acid. *J Clin Invest* 79:1782-7.
106. Nakagawa Y, Otsuki T, Coe FL (1989) Elucidation of multiple forms of nephrocalcin by ^{31}P -NMR spectrometer. *FEBS Lett* 250:187-98.
107. Nakagawa Y (1997) Properties and function of nephrocalcin: Mechanism of kidney stone inhibition or promotion. *Keio J Med* 46:1-7.
108. Nakamura M, Zhang Z, Shan L, Hisa T, Sasaki M, Tsukino R, Yokoi T, Kaname A, Kakudo K (1997) Allelic variants of human calcitonin receptor in the Japanese population. *Hum Genet* 99:38-41.
109. Nakamura E, Takahashi S, Ishikawa M, Okabe S (1999) Inhibitory effect of macrophage-derived factors on the recovery of wounds induced in rat gastric epithelial monolayers. *Biochem Pharmacol* 58:1221-7.
110. Nicholson GC, Moseley JM, Sexton PM, Mendelsohn FAO, Martin TJ (1986) Abundant calcitonin receptors in isolated rat osteoclasts. *J Clin Invest* 78:355-60.
111. Pak CYC, Britton F, Peterson R, Ward D, Northcut C, Breslau NA, McGuire J, Sakhaee K, Bush S, Nicar M, Norman DA, Peters P (1980) Ambulatory evaluation of nephrolithiasis: classification, clinical presentation, and diagnostic criteria. *Am J Med* 69:19-30.

112. Passeri G, Girasole G, Jilka RL, Manolagas SC (1993) Increased interleukin-6 production by murine bone marrow and bone cells after estrogen withdrawal. *Endocrinol* 133:822-8.
113. Petrucci M, Scott P, Ouimet D, Trouve ML, Proul X, Valiquette L, Guay G, Bonnardeaux A (2000) Evaluation of the calcium-sensing receptor gene in idiopathic hypercalciuria and calcium nephrolithiasis. *Kid Int* 58:38-42.
114. Piva R, Gambari R, Zorato F, Kumar L, del Senno L (1992) Analysis of upstream sequences of the human estrogen receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 183:996-1002.
115. Pratt RE, Dzau VJ (1999) Genomics and hypertension. Concepts, potentials, and opportunities. *Hypertension* 33:238-47.
116. Reed BY, Heller HJ, Gitomer WL, Pak CYC (1999) Mapping a gene defect in absorptive hypercalciuria to chromosome 1q23.3-q24. *J Clin Endocrinol Metab* 84:3907-13.
117. Resnick MI, Pridgen DB, Goodman HO (1968) Genetic predisposition to formation of calcium oxalate renal calculi. *N Eng J Med* 278:1313-8.
118. Rhee E, Santiago L, Park E, Lad P, Bellman GC (1998) Urinary IL-6 is elevated in patients with urolithiasis. *J Urol* 160:2284-8.
119. Ruggiero M, Pacini S, Aterini S, Fallai C, Ruggiero C, Pacini P (1998) Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with metastatic breast cancer. *Oncol Res* 10: 43-46.
120. Ruggiero M, Pacini S, Amato M, Aterini S, Chiarugi V (1999) Association between vitamin D receptor gene polymorphism and nephrolithiasis. *Miner Electrolyte Metab* 25:185-90.
121. Ryall RL (1997) Urinary inhibitors of calcium oxalate crystallization and their potential role in stone formation. *World J Urol* 15:155-64.

122. Sano M, Inoue S, Hosoi T, Ouchi Y, Emi M, Shiraki M, Orimo H (1995) Association of estrogen receptor dinucleotide repeat polymorphism with osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commun* 217:378-83.
123. Scheid C, Koul H, Hill WA, Luborz-Narod J, Kennington L, Honeman T, Fonassen J, Menon M (1996) Oxalate toxicity in LLC-Pk1 cells: Role of free radicals. *Kid Int* 49:413-9.
124. Scheinman SJ, Cox TP, Lloyd SE, Pearce SH, Salenger PV, Hoopes RR, Bushinsky DA, Wrong O, Asplin JR, Langman CB, Norden AG, Thakker RV (2000) Isolated hypercalciuria with mutation in CLCN5: relevance to idiopathic hypercalciuria. *Kid Int*;57:232-9.
125. Simkiss K, Wilbur KM (1989) *Biom mineralization; cell biology and mineral deposition*. Academic Press, San Diego.
126. Stanford JL, Just JJ, Gibbs M, Wicklund KG, Neal CL, Blumenstein BA, Ostrander EA (1997) Polymorphic repeats in the androgen receptor gene: molecular markers of prostate cancer risk. *Cancer Res* 57:194-8.
127. Steinkasserer A, Spurr NK, Cox S, Jeggo P, Sim RB (1992) The human IL-1 receptor antagonist gene (IL1RN) maps to chromosome 2q14-q21, in the region of the IL-1alpha and IL-1beta loci. *Genomics* 13:654-7.
128. Stevenson FK, Cleave AJ, Kent PW (1971) The effect of ions on the viscometric and ultracentrifugal behavior of Tamm Horsfall glycoprotein. *Biochim Biophys Acta*; 236:59-66.
129. Strachan T, Read AP (1999) Genetic mapping of complex characters. In: Strachan T, Read AP: *Human Molecular Genetics*. 2nd edi., John Wiley & Sons (Asia) Singapore, p287.
130. Strohmaier WL, Schlee-Giehl K, Bichler KH (1996) Osteocalcin response to calcium-restricted diet: a helpful tool for the workup of hypercalciuria. *Eur Urol*

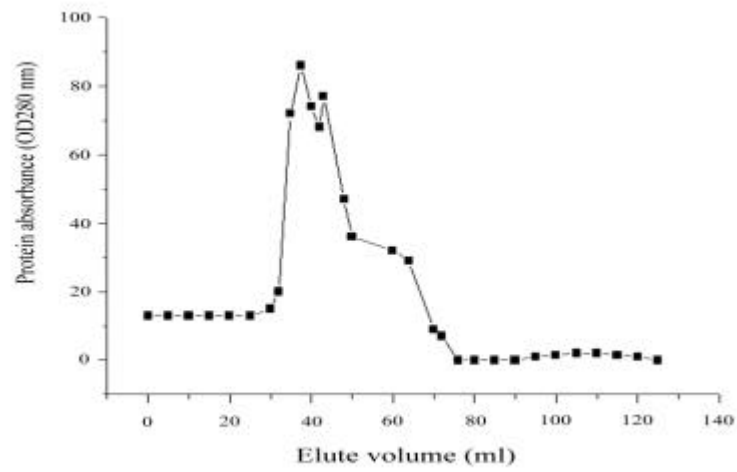
30:103-7.

131. Su Y, Chakraborty M, Nathanson MH, Baron R (1992) Differential effects of the 39,59-cyclic adenosine monophosphate and protein kinase C pathways on the response of isolated rat osteoclasts to calcitonin. *Endocrinology* 131:1497-502.
132. Sutor DJ (1969) Growth studies of calcium oxalate in the presence of various ions and compounds. *Br J Urol* 41:171-8.
133. Sutor DJ (1972) The nature of urinary stones. *In*: Finlayson B ed: *Urolithiasis: Physical aspects*. Washington DC. National Academy of Science p43.
134. Tang Y, Grover PK, Moritz RL, Simpson RJ, Ryall RL (1995) Is nephrocalcin related to the urinary derivative (bikunin) of inter--trypsin inhibitor? *Br J Urol* 776:425-30.
135. Tarlow JK, Clay FE, Cork MJ, Blakemore AIF, McDonagh AJG, Messenger AG, Duff GV (1994) Severity of alopecia areata is associated with a polymorphism in the interleukin-1 receptor antagonist gene. *J Invest Dermatol* 103:387-90.
136. Thamilselvan S, Hackett RL, Khan SR (1997) Lipid peroxidation in ethylene glycol induced hyperoxaluria and calcium oxalate nephrolithiasis. *J Urol* 157:1059-63.
137. Tiselius HG, Fornander AM, Nilsson MA (1993) The effects of citrate and urine on calcium oxalate crystal aggregation. *Urol Res* 21:363-60.
138. Tsai CY, Wu TH, Yu CL, Lu JY, Tsai YY (2000) Increased excretions of beta2-microglobulin, IL-6, and IL-8 and decreased excretion of Tamm-Horsfall glycoprotein in urine of patients with active lupus nephritis. *Nephron* 85:207-14.
139. Uribarri J, Man S, Carroll JH (1989) The first kidney stone. *Ann Int Med* 111:1006-9.
140. Urivetzky M, Sta Anna P, Smith AD (1988) Plasma osteocalcin levels in stone

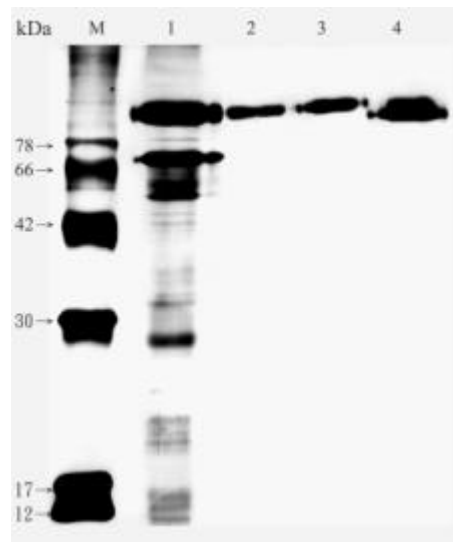
- disease: Potential aid in differentiation diagnosis of calcium nephrolithiasis. *J Urol* 139:12-4.
141. van Aswegen CH, Hurter P, vander Merwe CA, du Plessis DJ (1989) The relationship between total urinary testosterone and renal calculi. *Urol Res* 17:181-3.
 142. Verkoelen CF, Vander Boom BG, Schroder FH, Romijin JC (1997) Cell cultures and nephrolithiasis. *World J Urol* 15:229–35.
 143. Weisinger JR, Alonzo E, Bellorin-Font E, Blasini AM, Rodriguez MA, Paz-Martinez V, Martins R (1996) Possible role of cytokines on the bone mineral loss in idiopathic hypercalciuria. *Kid Int* 49:244-50.
 144. Wickham JEA, Buck AC (1990) *Renal tract stone: Metabolic basis and clinical practice*. Churchill Livingstone, Edinburgh.
 145. Wieacker PF, Knoke I, Jakubiczka S (1998) Clinical and molecular aspects of androgen receptor defects. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 106:446-53.
 146. Williams HE, Wandzilak TR (1989) Oxalate synthesis, transport and hyperoxaluric syndromes. *J Urol* 141:742-9.
 147. Worcester EM, Nakagawa Y, Wahner CL, Kumar S, Coe FL (1988) Crystal adsorption and growth slowing by nephroclacin, albumin, and Tamm-Horsfall protein. *Am J Physiol* 255:F1197–F1205.
 148. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D (1993) p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366:701-4.
 149. Yausi T, Fujita K, Sasaki S, Sato M, Sugimoto M, Hirota S, Kitamura Y, Nomura S, Kohri K (1999) Expression of bone matrix proteins in urolithiasis model rats. *Urol Res* 27:255-61.
 150. Yoon K, Rutledge SJC, Buenaga RF, Rodan GA (1988) Characterization of the rat osteocalcin gene: The stimulation of promoter activity by

- 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochemistry* 27:8521-6.
151. Yoshihara H, Yamaguchi S, Yachiku S (1999) Effect of sex hormones on oxalate-synthesizing enzymes in male and female rat livers. *J Urol* 161:668-73.
152. Zaidi M, Datta HK, Moonga BS, MacIntyre I (1990) Evidence that the action of calcitonin on rat osteoclasts is mediated by two G proteins acting via separate post-receptor pathways. *J Endocrinol* 126:473-81.
153. Zerwekh JE, Hughes MR, Reed BY, Breslau NA, Heller HJ, Lemke M, Nasonkin I, Pak CYC (1995) Evidence for normal vitamin D receptor messenger ribonucleic acid and genotype in absorptive hypercalciuria. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2960-5.
154. 李瀛輝、張心湜 (1991) 尿路結石之流行病學。In：李瀛輝、陳明村、張心湜著：尿路結石，台北，九州圖書文物公司 pp1-7.
155. 何春蓀 (1989) 普通地質學。台北，五南圖書出版公司。
156. 赫爾 WG 與馬格漢原著、貓頭鷹編譯小組翻譯 (1999) 生物學辭典。台北，貓頭鷹出版公司。
157. 梁繼文 (1988) 礦物學。台北，五南圖書出版公司。

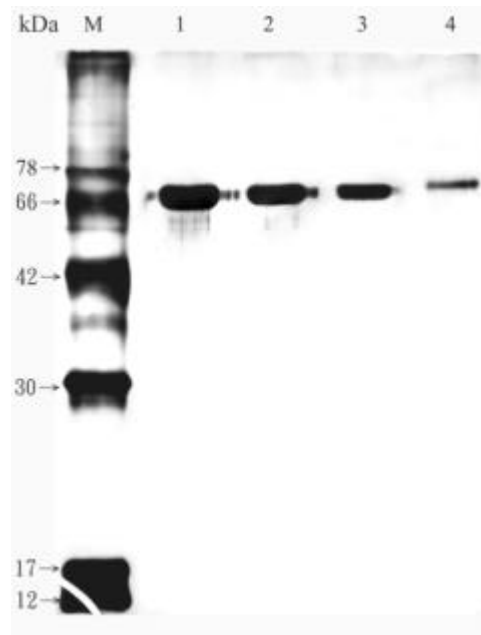
附錄一、圖



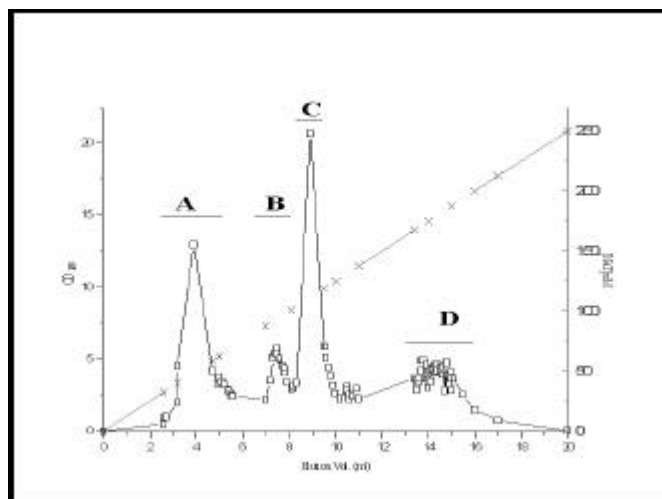
圖一、Sepharose 4B 層析波峰。THP 蛋白的出現在沖提波峰的高峰，此蛋白質是以電泳（圖二）來證實。



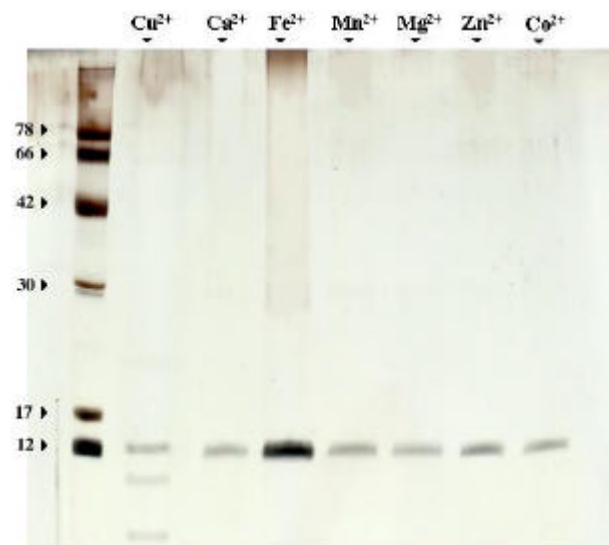
圖二、THP 蛋白的 SDS-PAGE 電泳和銀染顯像。M 是分子量標記，1 是原始尿液的蛋白質、2 是經第一道鹽析純化步驟的蛋白質溶液、3 是第二道 4B 層析的蛋白質溶液、4 是經唾液酸處理後的蛋白質溶液，染色帶微有下移之現象。



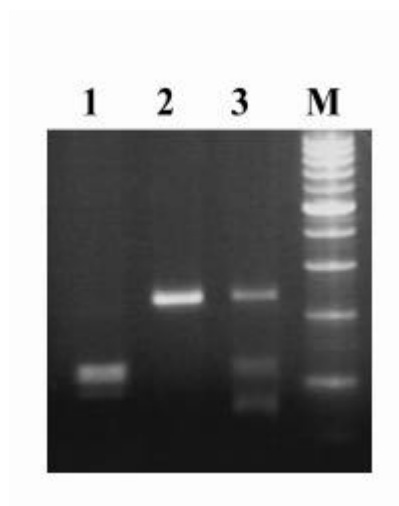
圖三、白蛋白的 SDS-PAGE 電泳和銀染顯像。M 是分子量標記，1 是原始溶液的蛋白質、2 是經純化步驟後的蛋白質溶液、3 是經唾液酸處理後的蛋白質溶液，染色帶沒有下移之現象。



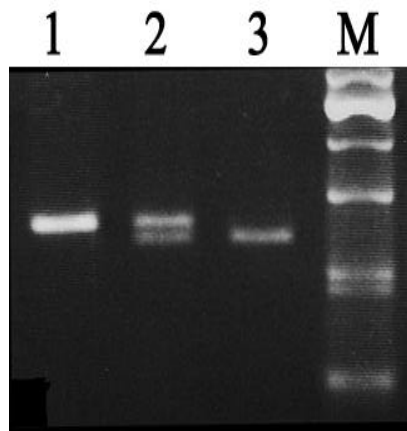
圖四、腎調鈣素的高效液相離子交換層析圖。0 到 250 mM NaCl 的梯度的沖提，共有 ABCD 四個波峰。



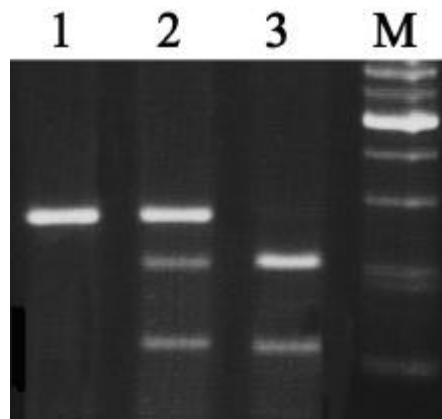
圖五、腎調鈣素的 SDS-PAGE 電泳圖。在與銅離子與維生素的交互作用中，腎調鈣素可以被切成兩個胜，其他二價離子則無此反應。



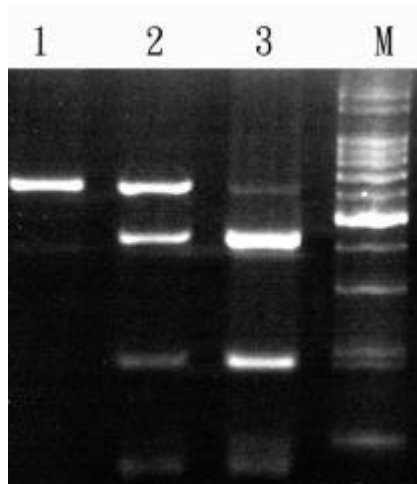
圖六、降血鈣素受體基因 *Alu* I 多形性的瓊膠電泳圖。1 是可切的 120-bp 及 108-bp，2 是不可切的 228 bp，3 是半切的異型合子，M 是鹼基長度的標記，梯度為 100bp。



圖七、破骨激素基因 *Hind* III 多形性的電泳圖。第一行是 253 bp 的不可切同源合子，第二行是異型合子，第三行則是 232-bp 與 21-bp 的可切同源合子，M 是標記，梯度為 100bp。

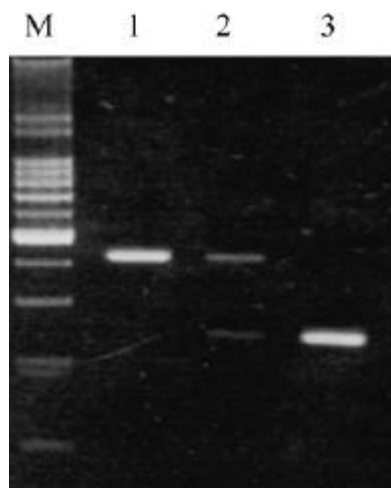


圖八、維生素 D 受體基因多形性的電泳圖。由 *Fok* I 所辨認的不能切的同源合子在第一條 (196-bp and 69-bp) ，第二是異型合子，可切的同源合子染色帶在第三條 (265 bp) ，M 是長度標記每條 100-bp 梯差。



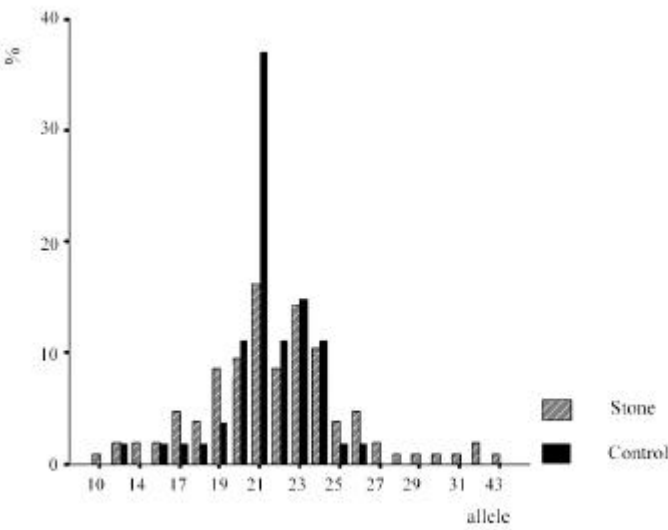
圖九、維生素 D 受體基因第八插入序列多形性的電泳圖。由 *Bsm* I 所辨認的有不可切的同源合子染色帶在第一條 (580 bp)，第二是異型合子，能切的同源合子在第三條 (405-bp and 175-bp)，M 是長度標記每條 100-bp 梯差。

圖十、白血球介素一受體拮抗者基因的 86-bp 前後銜接重複變異數聚合 鏈反應結果，M 是長度梯差，1 是“I”同源合子 410-bp 長，2 是 “I/II”的異型合子，3 是“II”的同源合子 240-bp 長。

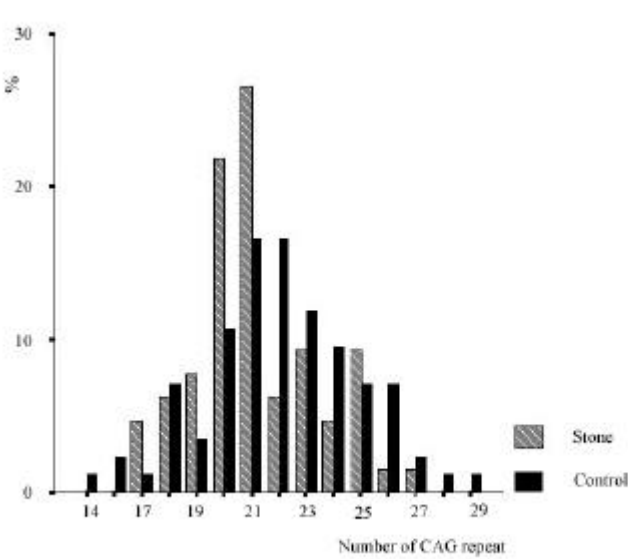


圖十一、雄性素受體基因 CAG 重複多形性的頻率分布圖，A.男性，B.女性。

A

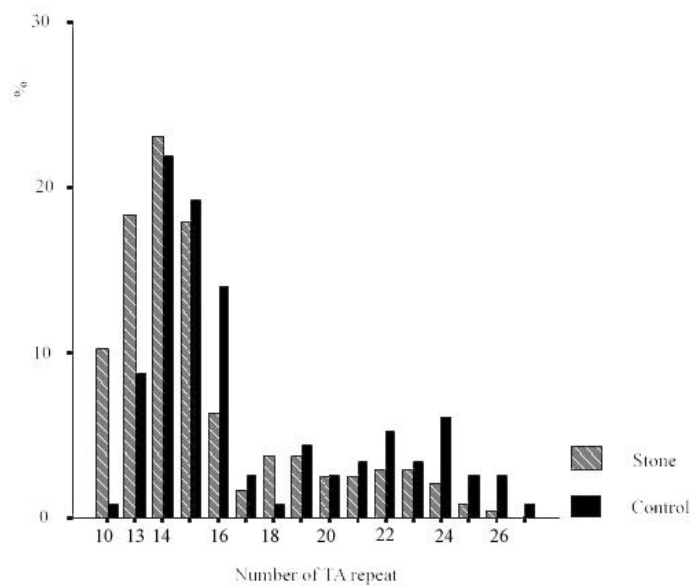


B

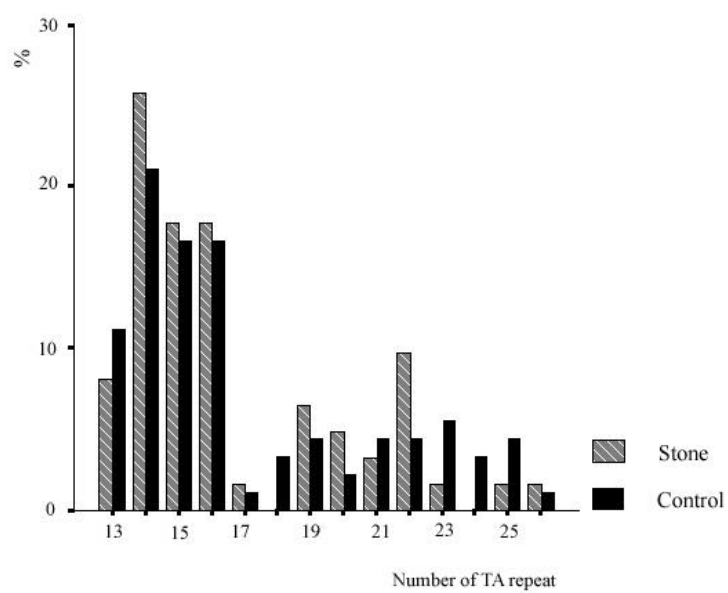


圖十二、雌性素受體基因 TA 重複多形性的頻率分布圖，A.男性，B.女性。

A



B



附錄二、個人經歷

姓名：陳汶吉

性別：男

出生年月日：46.08.01

出生地：彰化縣

學歷：

彰化縣伸港鄉大同國小（一至五年）：52.09~57.06

彰化市中山國小（第六年）畢：57.09~58.06

私立精誠中學國中部畢：58.09~61.06

省立彰化高中畢：61.09~64.06

私立中國醫藥學院中醫系畢業：65.09-72.06

中國醫藥學院中醫研究所碩士班畢業：72.09-76.01

國立清華大學生命科學院博士班肄業：86.09-迄今

經歷：

中國醫藥學院附設醫院 泌尿部住院醫師：72.07-75.05

三軍總醫院泌尿科 代訓醫師：75.06-76.05

中國醫藥學院附設醫院泌尿部 住院總醫師：76.06-76.07

中華民國陸軍野戰醫勤官：76.07~78.05

中國醫藥學院附設醫院泌尿部 住院總醫師：78.06~78.11

中國醫藥學院附設醫院泌尿部 主治醫師：78.11-82.01

雲林縣土庫鎮蔡醫院 副院長：82.02 – 84.03.

中國醫藥學院附設醫院泌尿部 主治醫師：84.04-迄今

中國醫藥學院講師：82.08 起迄今

近五年參與之研究計劃：

1. 間歇性清潔自我導尿在臨床上的應用：主持人，中國醫藥學院附設醫院：85.07-86.06
2. 尿路結石家族的可能分子基因連鎖圖：主持人，中國醫藥學院附設醫院：87.07-88.06
3. 人類膀胱癌病患 p53 基因 72 表現碼多形性的研究：主持人，中國醫藥學院附設醫院：88.07-89.06
4. 細胞週期素依賴蛋白激 抑制因子 p21 waf1/cip1 基因表現碼 31 多形性在膀胱癌患者與正常人分布的差別：主持人，中國醫藥學院附設醫院：89.07-90.06

論文發表情形

原著及病例報告

1. Chen Wen-Chi, Wu HC: Hyperoxaluria induced renal tubule injury and urolithiasis. Formosan J Med 1998;11(6):702-6.
2. Chen Wen-Chi, Lu HC, Wu HC, Lee T, Lee CW: Aspects of urolithiasis in Mid-Taiwan by 1095 stone analysis by infrared spectroscopy. In: Borghi L, Meschi

- T, Briganti A, Schianchi T, Novarini A eds: Kidney stones. Cosenza, Italy, Editoriale Bios, 1999; pp135-7.
3. Lu HF, Chen JH, Chen WC, Shen WC: Vesicle calculus caused by migrant intrauterine device. AJR 1999;173:505. **(SCI)**
 4. Wu RF, Chen WC, Wu HC, Yeh CC, Lu HF, Chang SS, Yang CC, Chou CL: Subcapsular hematoma of the kidney after extracorporeal shock-wave lithotripsy. J Urol R.O.C. 1999; 10:164-7.(correspondence)
 5. Lu CH, Chen WC, Wu HC, Lu HF: Transrectal ultrasonography findings in patients with hemospermia. CMJ (Taipei) 2000, 63:558-62. **(MI)**(correspondence)
 6. Chen WC, Lu HF, Wu HC, Li CW: Combined nephroscopy and ureteroscopy in the management of upper ureteral stone complicated with renal stones. In: Rogers AL, Hibbert BE, Hess B, Khan SR, Preminger GM eds: Urolithiasis 2000, University of Cape Town, South Africa 2000;pp660-1.
 7. Chang LC, Chen WC, Lin HS, Li CW: Rapid purification of nephrocalcin – a urinary stone inhibitors from normal individuals. In: Rogers AL, Hibbert BE, Hess B, Khan SR, Preminger GM eds: Urolithiasis 2000, University of Cape Town, South Africa 2000;pp146-7.
 8. Chen WC, Tsai FJ, Wu JY, Wu HC, Lu HF, Li CW: Distribution of p53 codon 72 polymorphism in bladder cancer – proline form is prominent in invasive tumor. Urol Res 2000; 28:293-6. **(SCI)**
 9. Lu CH, Lu HF, Chen WC, Wu HC: Infrared spectroscopic analysis of urinary tract stones. Mid Taiwan Med 2000;5:73-8. (correspondence)
 10. Chen CC, Chen WC, Lu HF, Wu HC: Urological problems in tethered cord syndrome. J Urol R.O.C. 2000;11:6-11. (correspondence)
 11. Chen WC, Tsai FJ, Wu JY, Wu HC, Li CW: Does Ser364Pro Mutation of Connexin43 Exist in Taiwanese Patients with Ivemark Syndrome? CMJ (Taipei) 2000, 63:691-5. **(MI)**
 12. Chen WC, Tsai FJ, Wu JY, Shi YR, Wu HC : Mutation Analysis of Human LEFTY A and LEFTY B Genes in Children with Ivemark Syndrome. Acta Pediatr Tw 2000; 41:259-262. **(MI)**
 13. Chen WC, Chen HY, Lu HF, Hsu CD, Tsai FJ: Association of Vitamin D Receptor Gene Start Codon *Fok* I Polymorphism with Calcium Oxalate Stone Disease. Br J Urol 2001;87:168-71. **(SCI)**
 14. Chen WC, Wu HC, Lu HF, Chen HY, Tsai FJ: Calcitonin Receptor Gene Polymorphism: A Possible Genetic Marker for Patients with Calcium Oxalate Stones in Taiwan. Eur Urol (in press) **(SCI)**
 15. Chen WC, Chen HY, Wu JY, Chen YT, Tsai FJ: Osteocalcin Gene *Hind* III Polymorphism Is Not Correlated with Calcium Oxalate Stone Disease. Urol Res (in

- press) (**SCI**)
16. Chen WC, Lu HF, Chen HY, Hsu CD, Tsai FJ: Arginine Form of p21 Gene Codon 31 is less prominent in Patients with Calcium Oxalate Stone. Urol Res (in press) (**SCI**)
 17. Chang LC, Lin HS, Chen WC: The Reappraisal of Nephrocalcin - Its Role in the Inhibition of Calcium Oxalate Crystal Growth and Interaction with Divalent Metal Ions. Urol Res (in press) (**SCI**) (correspondence)
 18. Chen WC, Chen HY, Hsu CD, Tsai FJ: No association of vitamin D receptor gene *Bsm* I polymorphisms in patients with calcium oxalate stone. Mol Urol (in press) (**MI**)
 19. Chen WC, Lin HS, Chen HY, Shih CH, Li CW: Effects of Tamm-Horsfall protein and albumin in the inhibition of calcium oxalate crystallization between native and enzymatic deglycosylation conditions. Mol Urol (in press) (**MI**)
 20. Chen WC, Wu HC, Lin WC, Wu MC, Hsu CD, Tsai FJ: The Association of Androgen Receptor Gene and Estrogen Receptor Gene Polymorphisms with Urolithiasis in Males. BJU (submit)
 21. Chen WC, Wu HC, Chen HY, Wu MC, Hsu CD, Tsai FJ: Interleukin – I Beta Gene and Receptor Antagonist Gene Polymorphisms in Patients with Calcium Oxalate Stone. Urol Res (Revised)