J. Toxicol. Pub. Health
Vol. 23, No. 1, pp. 55-63 (2007)

Official Journal of
Korean Society of Toxicology
Available online at http://www.toxmut.or.kr

Diethylnitrosamine 처리 후 병리학적 결과를 기초로 한 마우스 간에서의 유전자 발현 분석

김지영[1] · 윤석주[1] · 박한진[1] · 김용범[1] · 조재우[1] · 고우석[1] · 이미가엘[2]
[1]한국화학연구원 부설 안전성평가연구소, [2]시립인천대학교 자연과학대학 생물학과

Gene Expression Profiling in Diethylnitrosamine Treated Mouse Liver: From Pathological Data to Microarray Analysis

Ji-Young Kim[1], Seokjoo Yoon[1], Han-Jin Park[1], Yong-Bum Kim[1], Jae Woo Cho[1], Woo Suk Koh[1] and Michael Lee[2]

[1]Korea Institute of Toxicology, Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon
[2]Department of Biology, College of Natural Sciences, University of Incheon, Incheon, Korea

Received March 5, 2007; Accepted March 9, 2007

Diethylnitrosamine (DEN) is a nitrosamine compound that can induce a variety of liver lesions including hepatic carcinoma, forming DNA-carcinogen adducts. In the present study, microarray analyses were performed with Affymetrix Murine Genome 430A Array in order to identify the gene-expression profiles for DEN and to provide valuable information for the evaluation of potential hepatotoxicity. C57BL/6NCrj mice were orally administered once with DEN at doses of 0, 3, 7 and 20 mg/kg. Liver from each animal was removed 2, 4, 8 and 24 hrs after the administration. The histopathological analysis and serum biochemical analysis showed no significant difference in DEN-treated groups compared to control group. Conversely, the principal component analysis (PCA) profiles demonstrated that a specific normal gene expression profile in control groups differed clearly from the expression profiles of DEN-treated groups. Within groups, a little variance was found between individuals. Student's *t*-test on the results obtained from triplicate hybridizations was performed to identify those genes with statistically significant changes in the expression. Statistical analysis revealed that 11 genes were significantly downregulated and 28 genes were upregulated in all three animals after 2 h treatment at 20 mg/kg. The upregulated group included genes encoding *Gdf15*, *JunD1*, and *Mdm2*, while the genes including *Sox6*, *Shmt2*, and *Slc6a6* were largely down regulated. Hierarchical clustering of gene expression also allowed the identification of functionally related clusters that encode proteins related to metabolism, and MAPK signaling pathway. Taken together, this study suggests that match with a toxicant signature can assign a putative mechanism of action to the test compound if is established a database containing response patterns to various toxic compounds.

Key words: Microarray, Diethylnitrosamine, Histopathology, Gene expression, Toxicogenomics.

서 론

신물질이나 환경유해물질 등의 독성을 검색하기 위한 전통적인 독성 기법은 오랜 시간과 숙련된 인력을 필요로 함은 물론 물질 당 20억원 이상의 고비용과 인간에 대한 독성 예측면에서 부정확성 등의 단점을 지니고 있다. 현재 다량으로 생성되는 신물질의 독성을 이러한 전통적인 방법만으로는 검색하기에는 무리가 따르므로 더 빠른 시간 내에 간편하게 독성을 알아볼 수 있는 시험법의 확립이 요구되고 있다. 더구나, 물질 당 수백마리이상의 과다한 동물 사용 등은 동물 복지를 주장하는 동물단체 등의 거센 항의로 인해서 유럽등지에서는 이에 대한 문제가 크게 대두되고

Correspondence to: Michael Lee, Department of Biology, College of Natural Sciences, University of Incheon, 177 Dowha-dong, Nam-gu, Incheon 402-749, Korea
E-mail: mikelee@incheon.ac.kr

있어서 최소한의 동물의 사용으로 빠른 시간 내에 정확하게 많은 시험물질에 대한 독성 예측을 위한 시스템의 개발이 시급한 실정이다. 이러한 추세와 유전체학의 발달과 더불어 최근 크게 각광 받고 있는 분야가 DNA 칩을 이용한 독성유전체학이다(Brown and Botstein, 1999; Fielden and Zacharewski, 2001; Pennie and Kimber, 2002).

현재까지는 DNA chip을 이용한 실험의 경우 그 비용이 상당하기 때문에 많은 실험실에서는 세포주를 사용하여 실험을 수행하는 경우가 많았다. 하지만, 궁극적으로 *in vivo* 모델을 사용하여 동일조직에서 병리학적 소견과 함께 그 결과가 제시되어야 실제 독성예측에 사용할 수 있는 유전정보를 구축할 수 있으므로 *in vivo* 모델을 이용한 독성유전체 실험이 필수불가결이라고 할 수 있다. 특히, 간은 여러 환경적 또는 의학적 물질들의 표적 장기로서 이들의 무독성화와 제거에 중심역할을 하므로 독성연구에 있어서 가장 중요한 장기라고 할 수 있으므로 간에 대한 독성 연구를 수행하는 것이 일차적 목적이 될 수 있다. 지금까지 간 독성 측정방법으로는 serum aminotransferase 등의 생화학적 간 검사와 microsomal enzyme induction 등이 있었으나 이러한 측정법 등은 위양성이나 위음성 등이 높고 그 기작에 대한 정보를 전혀 제공하지 못하는 단점이 있다. DNA 칩을 이용, 간 독성에 특이적인 유전자 profile 정보를 구축한다면 이러한 단점 보완은 물론 그 독성 기작까지 알아낼 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 고무나 염색, 주물공장 등에서 흡입에 의해 인간에 노출되어 간 독성을 유발하는 것으로 널리 알려진 DEN을 이용하여 간 독성시 변화되는 유전자 profile을 알아보았다. DEN의 경우 인간에서는 그 발암여부가 알려져 있지는 않지만 rat을 이용한 실험결과에서는 강력한 간 발암물질로 알려져 있고(US EPA/IRIS on N-Nitrosodiethylamine(CASRN 55-18-5); http://www.epa.gov/iris/subst/0042.htm), DNA adduct 및 DNA strand breaks 등을 일으키는 것으로 알려져 있다(Tatematsu *et al.*, 1988). 따라서, 간독성 유발물질로 널리 알려진 DEN에 의해서 조절되는 유전자 발현 profile에 대한 database가 구축되면 일반적인 간 독성 기작은 물론 간암으로 발전하는데 관여하는 기작에 대한 정보까지 얻을 수 있을 것으로 보인다. 더불어, 차후 유사한 간 독성을 보이는 물질의 screening system에도 이를 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

재료 및 방법

시험계 및 사육환경. 실험에 사용될 8주령의 특정병원체부재(SPF) C57BL/6NCrj mouse를 Charles River (Japan)에서 구입하고 약 4주간의 순화기간을 거친 후 12주령에 실험에 사용하였다. 사육환경은 온도 23 ± 3°C, 상대습도 50 ± 10%, 환기횟수 10~20회/hr, 조명시간 12 hr(08:00 점등~20:00 소등), 조도 150~300 Lux로 설정된 안전성평가연구소의 안전성시험연구동 (대전)에서 실시하였다. 사료는 실험 동물용 고형사료(Purina Rodent Chow 5057)를 방사선 멸균하여 자유섭취 시켰다. 본 시험은 실험동물의 관리 및 사용에 적용할 수 있는 모든 규정을 준수하여 실시하며(AAALAC International 인증 획득, 1998), 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소의 동물관리사용위원회(IACUC)가 검토하였다.

용량 설정 시험 및 시험물질의 투여. 본 시험을 위한 DEN의 투여용량은 참고문헌을 바탕으로 설정한 용량을 가지고 예비시험을 통하여 결정하였다. Williams 등(Williams *et al.*, 1996)에 따르면 DEN을 마우스에서 경구투여시의 LD_{50} 값은 200 mg/kg 이므로 최고농도군을 200 mg/kg으로 하고 공비 2로서 부형제 대조군 포함 4단계 처리군에 군 당 2마리씩 1회 경구투여하고, 24시간 후 부검하여 간 조직의 이상 유무를 판단하였다. 예비시험 결과를 토대로 조직병리학적 검사에서 간 조직에 독성을 유발하지 않는 범위내에서 더 높은 투여 용량이 독성을 유발할 것으로 예측되는 농도를 최고농도로 설정하고 부형제 대조군과 함께, 3, 7, 20 mg/kg 농도군으로 본 시험을 수행하였다. 체중범위에 따른 무작위법에 의해 군을 분리한 C57BL/6NCrj 마우스에 DEN 투여 후 2, 4, 8, 24시간째에 에테르 마취 후 간을 적출하였다. 각 군 당 3마리의 동물을 사용하였다. 시험물질은 경구로 투여하고 용매는 saline을 사용하였다.

RNA 분리 및 조직병리를 위한 간 조직의 채취. 각 투여시간 및 투여용량별로 시료채취를 실시하였다. 마우스의 에테르마취 후 심장정지 2분내에 간을 적출하였다. RNA 분리를 위해서 간 조직을 부위가 다른 3군데를 무작위적으로 채취한 후 RNA*later*(Ambion Inc., USA) 용액에 보관하고 2~8°C에서 overnight 후 -80°C에 보관하였다. 조직병리 소견을 관찰하기 위한 간 조직 샘플은 RNA용으로 적출된 간 조직 이외의 부위를 사용하였다. 모든 동물에서 균일하게 내측좌엽과 외측우엽 2부위의 엽을 채취하였다. 병리조직 관찰을 위한 염색법은 Hematoxylin/Eosin(HE) 염색, PAS 염색, 그리고 reticulin 염색법을 사용하였다. 조직용 시료는 10%의 중성 포르말린 용액에 고정시켰다. 10일 이상 충분한 고정을 거친 장기조직은 파라핀 포매기(Leica EG1160)로 포매하여 로타리 마이크로톰(Leica 820)으로 3~5 μm 절편을 만들어 3가지 염색

법으로 염색을 한 후, 광학현미경으로 병리조직을 관찰하였다.

혈액 생화학용 혈액 채취. 혈액생화학 검사를 위한 혈액은 하대정맥에서 채취하였다. 항응고제로 처리한 혈액을 4000 rpm으로 20분간 원심분리를 시킨 후 분리된 혈청을 분석하기 전까지 -70°C에 보관하였다. 자동혈청생화학분석기(Shimadzu CL-7200)를 이용하여 alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST), alkaline phosphatase(ALP) 등의 항목을 측정하였다.

추출한 간으로부터 Total RNA의 분리. Total RNA는 Qiagen에서 구입한 RNeasy mini kit를 이용하여 제조사의 방법에 따라 분리하였다. 분리한 RNA는 실험에 사용하기 전까지 -80°C에 보관하였다. 분리된 total RNA는 nanodrop 1000 (Nanodrop, USA)을 이용하여 정량하였다. 정량을 마친 total RNA를 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technology, USA)을 이용하여 degradation 여부를 확인하였다.

DNA microarray analysis. Total RNA로부터 cDNA 합성은 RNA sample 5 μg을 template로 하여 T7-oligo (dT) primer와 GeneChip® One-Cycle cDNA Synthesis Kit(Affymetrix, P/N 900431)를 이용하여 수행하였다. 합성한 ds cDNA는 GeneChip® Sample Cleanup Module (Affymetrix, P/N 900371)을 통해서 clean-up 시켜준 후 biotin labeling을 위해 사용하였다. GeneChip® IVT Labeling Kit(Affymetrix, P/N 900449)에 합성한 ds cDNA를 넣고 37°C에서 16시간 정도 incubation 하였다. 이렇게 합성한 cRNA는 GeneChip® Sample Cleanup Module을 사용하여 clean-up 하였다. biotin-labeled cRNA는 hybridization kinetics를 높이고 2차 구조를 줄이기 위해서 GeneChip® Poly-A RNA Control Kit(Affymetrix, P/N 900433)를 이용하여 35~200 bp로 fragmentation을 해주었다. Hybridization을 위해 사용할 때까지 -80°C에 보관하였다. Hybridization cocktail(control cRNA, BSA, oligo B2, herring sperm DNA, target cRNA mix)을 준비한다. 22,600개의 probe sets를 가지고 약 14,000개의 유전자 수준을 측정할 수 있는 Murine Genome 430A 2.0 Array (Affymetrix, USA)에 130 ml의 hybridization cocktail을 주입하고 GeneChip hybridization oven 640을 이용하여 60 rpm, 45°C에서 16시간동안 hybridization 하였다. GeneChip fluidics station (model 450)을 이용하여 GeneChip Operating Software(GCOS)에서 해당 protocol을 이용하여 washing하였다. Washing이 끝난 후 streptavidin phycoerythrin을 이용하여 staining하였다.

Data analysis. 군 당 3마리씩 사용한 각각의 동물에 대한 유전자 발현 signal의 variation을 확인하기 위하여 수행한 scatter graph plot 분석결과, 같은 군 사이에서의 유전자 발현의 변화차이는 그다지 크지 않음을 알 수 있었다. 발현된 유전자의 intensity와 microarray 분석은 GenePlex software version 2.3(Istech Inc., Korea)을 이용하여 수행하였다. Data normalization은 global scale normalization을 이용하여 수행하였고, 적어도 한 time point에서 통계학적 분석을 이용하여 2배 이상 발현량이 변화한 유전자를 선별하였다. 통계학적 유의성은 Student's *t*-test에서 *p* value가 0.01 이하인 경우를 대상으로 하였다. 선별된 유전자는 Pearson correlation과 complete linkage를 기초로 하는 two-dimensional hierarchical clustering 분석을 하였고(Eisen *et al.*, 1998), 부형제 대조군과 각 농도군사이의 차이를 위해서는 Principal Component Analysis (PCA) 분석을 수행하였다(Yeung and Ruzzo, 2001). 또한, NetAffx (http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx)에서 선별된 유전자의 정보검색을 실시하였고, 각 유전자의 기능별 구분은 KEGG pathway (http://www.genome.jp/kegg/pathway.html)에 따랐다.

결 과

용량 설정 시험. 본 시험의 투여용량을 설정하기 위한 예비시험에서는 참고문헌(Williams *et al.*, 1996)을 바탕으로 0, 25, 50, 100, 200 mg/10 ml/kg로 하여 각 농도군 당 2마리씩 경구투여하고, 24시간 후 부검하여 간 조직의 이상 유무를 판단하였다. 사망동물은 발견되지 않았으나 병리조직검사결과, 50 mg/kg 이상의 농도군에서는 확실한 병변으로서 hepatocellular vaculoation이 관찰되었고 25 mg/kg 투여군에서는 아주 미약하게 관찰되었다 (data not shown). Microarray분석에서는 병변이 관찰되지 않을 것으로 예측되는 가장 높은 농도에서의 유전자 발현 profile을 보기 위하여 20 mg/kg 농도군을 고농도로 설정하여 0, 3, 7, 20 mg/10 ml/kg로 본 시험을 수행하였다.

병리 조직학적 검사. DEN 투여 후, 정해진 시간에 조직병리의 관찰을 위해서 부위가 다른 5군데의 간 조직을 채취하였다. 병리조직 관찰을 위해서 조직 검체는 일반염색으로 조직관찰을 위한 Hematoxylin/Eosin(HE) 염색과 (Fig. 1), 특수염색으로 glycogen 염색을 위한 PAS 염색

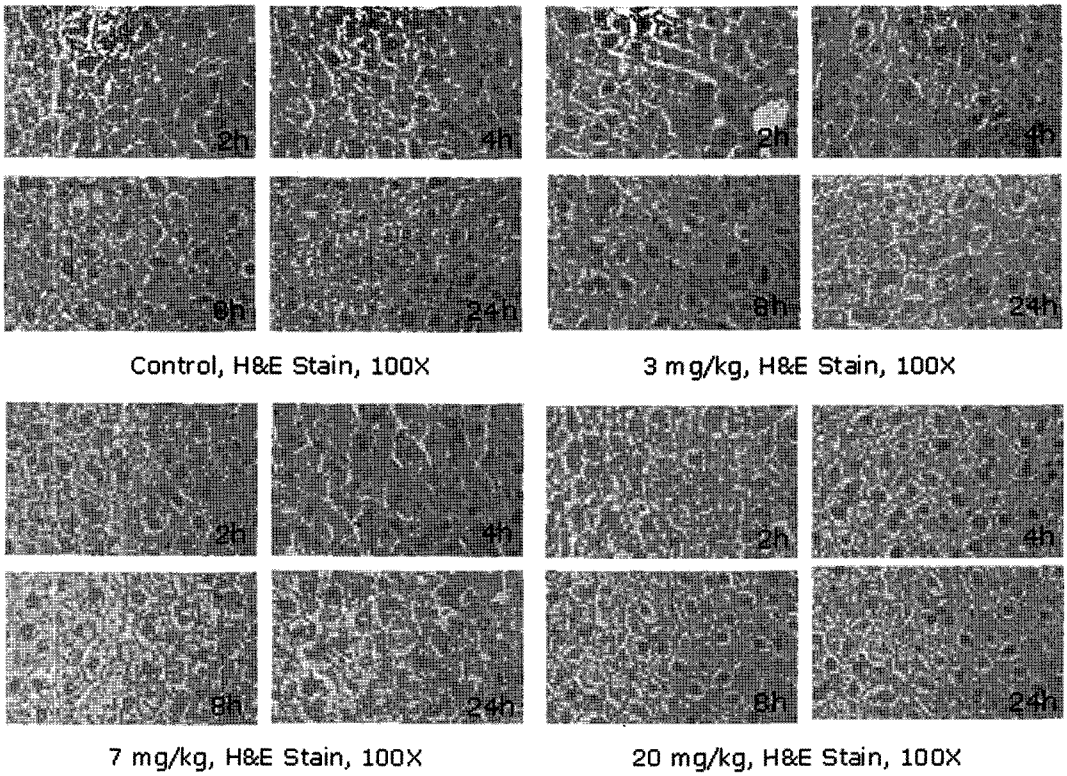

Fig. 1. Representative histological liver sections from control or mouse treated with DEN. All sections stained with haematoxylin-eosin (H&E) are shown at 100 × magnification.

과 결합조직 염색을 위한 reticulin 염색 후(data not shown), 병리조직을 관찰하였다. 투여한 모든 용량군 범위 내에서는 시간대에 관계없이 모두 정상 소견을 나타내었다.

혈액 생화학적 검사. 간 조직채취와 동시간 대에 채취한 혈액으로부터 분리된 혈청은 자동혈청생화학분석기(Shimadzu CL-7200)를 이용하여 ALT, AST 및 ALP를 측정하였다. 측정결과 각각의 수치에서 모든 용량군의

Table 1. Serum biochemical values of male C57BL/6 mouse (group summary)

Group		AST (aspartate aminotransferase)	ALT (alanine aminotransferase)	ALP (alkaline phosphatase)
Time after treatment	DEN[a] (mg/kg)			
2	0	124.8 ± 45.6	47.8 ± 9.5	350.6 ± 101.1
	3	116.0 ± 44.6	50.1 ± 14.1	319.3 ± 25.4
	7	60.9 ± 3.9	30.0 ± 1.0	336.0 ± 0.0
	20	111.0 ± 20.5	53.8 ± 13.1	339.3 ± 22.0
4	0	77.6 ± 10.5	38.7 ± 4.0	355.0 ± 27.2
	3	69.1 ± 16.7	35.2 ± 1.5	305.7 ± 7.1
	7	55.4 ± 5.1	25.7 ± 4.0	321.3 ± 25.3
	20	63.1 ± 13.8	33.3 ± 5.3	320.3 ± 43.5
8	0	51.2 ± 8.5	27.0 ± 5.2	350.7 ± 11.0
	3	49.5 ± 1.1	26.1 ± 1.5	296.7 ± 10.0
	7	67.8 ± 29.4	31.6 ± 10.4	333.7 ± 18.9
	20	63.1 ± 11.3	34.3 ± 2.3	288.3 ± 31.5
24	0	43.5 ± 6.3	24.4 ± 2.2	312.0 ± 9.5
	3	40.1 ± 1.7	27.9 ± 3.7	314.0 ± 55.1
	7	38.1 ± 1.4	21.6 ± 2.5	271.0 ± 51.4
	20	41.6 ± 5.1	24.4 ± 0.6	301.0 ± 13.7

[a]DEN, diethylnitrosamine; dissolved in saline.

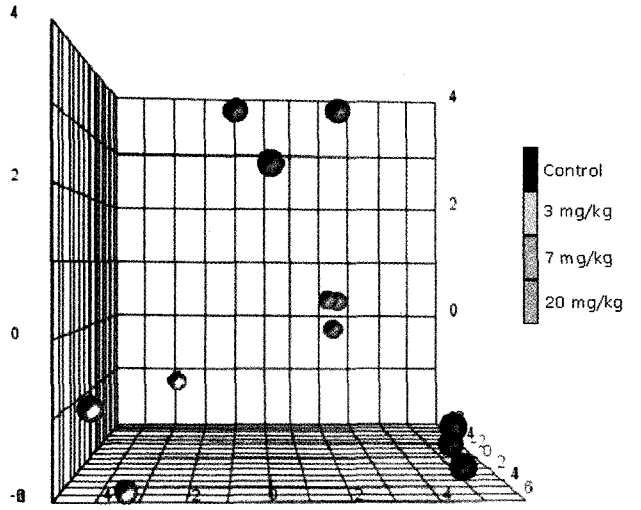

Fig. 2. Principal component analysis illustrates differentiation of gene expression profile in DEN-treated liver from the control. A little variance is found between individuals from same group.

DEN 투여군과 부형제 투여군 사이에 유의성이 있는 차이는 관찰되지 않았다(Table 1).

Microarray analysis.

Principal Component Analysis(PCA) 분석: 부형제 대조군과 각 농도군 사이의 차이는 PCA 분석을 통하여 알아보았다(Fig. 2). PCA 분석 결과는 유전자 발현 profile이 각 처리군에 따라 확연하게 다름을 보여주고 있다. 반면, 같은 처리군내에서는 비록 고용량군에서 약간의 차이를 보이기는 하지만 전체적으로 3마리씩 사용한 각각의 동물에 대한 유전자 발현 signal의 차이는 매우 적음을 보여주고 있다.

Hierarchical clustering 분석: 각 처리군에 따라서 발현량이 유의성 있게 변화한 유전자를 선별하기 위하여 Student's *t*-test를 수행하였다. 부형제 대조군과 각 용량군을 각각 비교하여 *p*-value가 0.01 이하이면서 발현량이 2배 이상 증감한 유전자만 선별하였다. 하지만, 투여한 용량군에서 DEN에 의한 뚜렷한 독성증상이 나타나지 않은 것처럼 유전자발현 profile에서도 투여군에서 뚜렷하게 발현량이 증감한 유전자가 많지 않았다. 투여 후 시간대별 분석에 있어서도 오히려 24시간째에는 거의 변화량이 관찰되지 않았고 2시간째에 유전자 발현량의 증감이 많이 관찰되었다. 따라서, 2시간째를 기준으로 각 투여용량군에 따른 유전자발현 변화량에 대해서 hierarchical clustering 분석을 수행하였다(Fig. 3). Hierarchical clustering에서는 분석된 유전자들이 발현 양상에 따라 7개의 cluster로 구분되었다. 특히, cluster 1과 cluster 5는 각

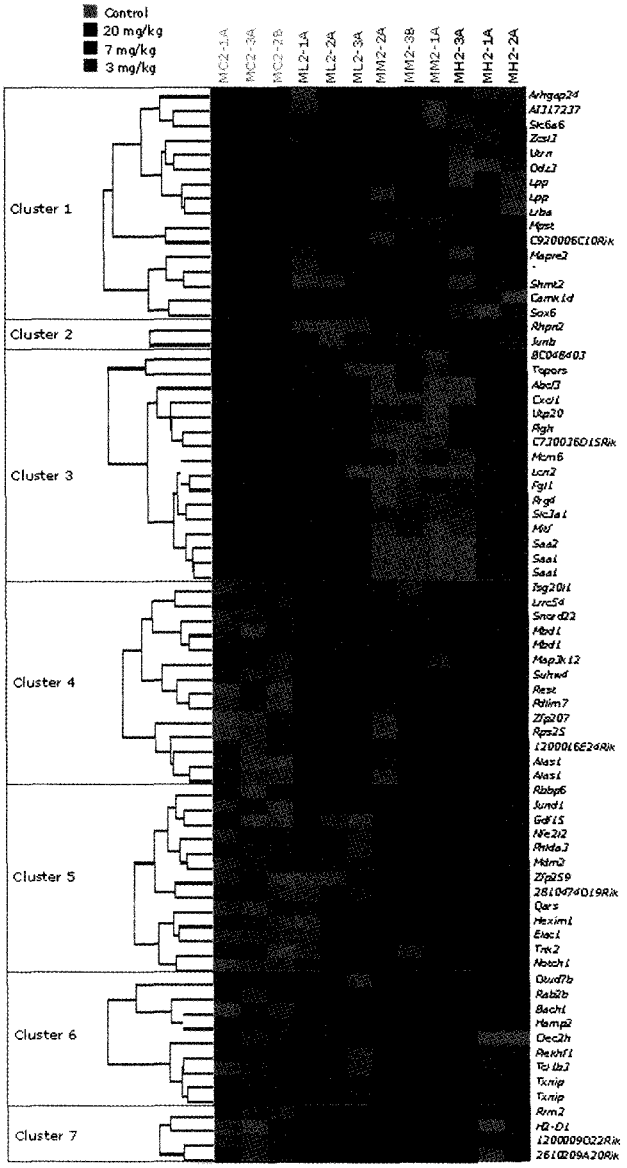

Fig. 3. Characteristic gene expression profiles induced by DEN administration. The data were analyzed by hierarchical clustering, which organizes transcripts and treatments on the basis of similarity. Green represents down-regulation of the transcripts, black means no change, and red represents up-regulation of the transcript. Clustering was performed using complete linkage clustering with a centered correlation coefficient as the similarity metric.

각 투여 용량에 따라 발현량이 증가 또는 감소하는 유전자들을 포함하고 있다.

발현량이 변화한 유전자의 선별: DEN 투여 2시간째에 유전자 발현증감이 가장 뚜렷했기 때문에 2시간째에 통계학적인 유의성($p < 0.01$)을 보인 유전자를 선별하였다. 2시간째에 선별된 유전자는 농도군에 따라 달라서, 3 mg/kg 투여군의 경우 12개 유전자, 7 mg/kg 투여군의

Table 2. Genes showing ≥ twofold changes after 2 h administration of 20 mg/kg DEN

GenBank accession no	Gene symbol	Gene title	Fold change	GO molecular function
NM_011819	Gdf15	growth differentiation factor 15	5.87	cytokine activity
NM_010592	Jund1	Jun proto-oncogene related gene d1	3.43	transcription factor activity
NM_010786	Mdm2	transformed mouse 3T3 cell double *minute* 2	3.30	ubiquitin-protein ligase activity
NM_013750	Phlda3	pleckstrin homology-like domain, family A, member 3	3.22	no information
NM_011857	Odz3	odd Oz/ten-m homolog 3 (Drosophila)	2.96	*no information*
NM_026531	Isg20l1	interferon stimulated exonuclease gene 20-like 1	2.96	exonuclease activity
NM_011263	Rest	RE1-silencing transcription factor	2.78	transcriptional repressor activity
NM_138753	Hexim1	hexamethylene bis-acetamide inducible 1	2.75	specific transcriptional repressor activity
NM_013594	Mbd1	methyl-CpG binding domain protein 1	2.75	DNA binding
NM_008714	Notch1	Notch gene homolog 1 (Drosophila)	2.73	transcription factor activity
NM_011752	Zfp259	zinc finger protein 259	2.67	nucleic acid binding
NM_016788	Tnk2	tyrosine kinase, non-receptor, 2	2.66	protein-tyrosine kinase activity
NR_002896	Snord22	small nucleolar RNA, C/D box 22	2.54	protein binding
NM_011247	Rbbp6	retinoblastoma binding protein 6	2.41	protein binding
NM_053255	Elac1	elaC homolog 1 (E. coli)	2.34	endonuclease activity
NM_026054	2810474O19Rik	RIKEN cDNA 2810474O19 gene	2.32	no information
NM_007520	Bach1	BTB and CNC homology 1	2.26	*transcription factor activity*
NM_010902	Nfe2l2	nuclear factor, erythroid derived 2, like 2	2.19	transcription factor activity
NM_026131	Pdlim7	PDZ and LIM domain 7	2.19	protein binding
NM_020559	Alas1	aminolevulinic acid synthase 1	2.18	acyltransferase activity
NM_009582	Map3k12	mitogen activated protein kinase kinase kinase 12	2.15	protein kinase activity
NM_001024619	Lrrc54	leucine rich repeat containing 54	2.10	no information
NM_146224	Suhw4	suppressor of hairy wing homolog 4 (Drosophila)	2.09	DNA binding
NM_133794	Qars	glutaminyl-tRNA synthetase	2.06	glutamine-tRNA ligase activity
NM_173022	BC048403	cDNA sequence BC048403	2.05	no information
NM_020559	Alas1	aminolevulinic acid synthase 1	2.04	acyltransferase activity
NM_013594	Mbd1	methyl-CpG binding domain protein 1	2.03	DNA binding
NM_001025613	Otud7b	OTU domain containing 7B	2.01	ubiquitin thiolesterase activity
NM_011682	Utrn	*utrophin*	0.50	*transmembrane receptor activity*
NM_178665	Lpp	LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma	0.49	protein binding
NM_172819	AI317237	expressed sequence AI317237	0.48	*ligase activity*
NM_030695	Lrba	LPS-responsive beige-like anchor	0.48	protein kinase A binding
NM_029270	Arhgap24	Rho GTPase activating protein 24	0.45	GTPase activator activity
NM_026992	Zcsl3	zinc finger, CSL-type containing 3	0.45	heat shock protein binding
NM_178665	Lpp	LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma	0.44	protein binding
NM_177343	Camk1d	calcium/calmodulin-dependent protein kinase ID	0.43	protein kinase activity
NM_009320	Slc6a6	solute carrier family 6	0.37	beta-alanine transporter activity
NM_028230	Shmt2	serine hydroxymethyl transferase 2 (mitochondrial)	0.37	methyltransferase activity
NM_011445	Sox6	SRY-box containing gene 6	0.33	transcription factor activity

경우 29개 유전자, 20 mg/kg 투여군의 경우 39개 유전자의 발현변화가 유의성 있게 증감하는 것으로 나타났다. *Alas1* 유전자의 경우, 3 mg/kg 투여군에서는 물론 20 mg/kg 투여군에서도 유의성이 있는 것으로 나타났다. 또한, *Rest* 유전자를 비롯, *Bach1*, *Pdlim7*, *Qars* 유전자 등은 7 mg/kg 투여군과 20 mg/kg 투여군에서 모두 유의성이 있는 유전자 발현 변화를 보인 것으로 나타났다. 아래의 Table 2는 가장 많은 유전자가 선별된 20 mg/kg 투여군에서의 유전자 list를 보여준다. 특히, growth differentiation factor의 일종인 *Gdf15*는 부형제 대조군에 비해서 5.87배나 발현량이 증가하였고, 전사조절인자의 일종인 *Jund1*과 ubiquitin-protein ligase 활성을 가진

*Mdm2*도 3배 이상 발현량이 증가하였다. 반대로 전사조절인자인 *Sox6*와 methyltransferase 활성도를 가진 *Shmt2*, nine transporter인 *Slc6a6* 등은 2배 이상 발현량이 감소하였다.

고 찰

본 연구에서는 간에서 독성을 유발하는 물질이 간에서 발현량을 변화시키는 유전자 profile을 알아보기 위하여 Murine Genome 430A 2.0 Array (Affymetrix)를 사용하여 간독성 물질에 대한 microarray 실험을 수행하였다. 간에서 독성을 유발하는 물질로는 고무나 염색, 주물공장 등에서 흡입에 의해 인간에 노출되어 간 독성을 유발하는 것으로 널리 알려진 DEN을 선정하였다. DEN은 hepatic carcinoma를 유발하는 nitrosamine 화합물의 일종으로서, DNA 손상을 일으킴으로써 간 독성과 더 나아가서 간암을 유발하는 것으로 알려져 있다(Qian *et al.*, 1997). 본 연구에서는 세포독성에 의해서 유발될 수 있는 보편적인 유전자의 발현변화를 배제하고 시험물질에 의해서만 특이적으로 변화되는 유전자 발현 profile을 찾기 위하여 간 독성을 유발하지 않는 농도범위 내에서 최고농도를 선택하여 microarray 실험을 수행하고자 하였다. 기존의 보고에(Driver and McLean, 1986; LeBoeuf *et al.*, 1985; Shivapurkar *et al.*, 1986) 의하면 DEN은 25~200 mg/kg 용량범위에서 rat에서 암을 유발하는 것으로 알려져 있기 때문에, 이 용량범위에서 microarray 실험에 사용할 용량을 설정하기위한 예비시험을 수행하였고 20 mg/kg를 microarray 실험을 위한 최고용량으로 설정하고 3단계 용량군을 마우스에 투여하였다. 투여 결과, 모든 병리조직학적 검사와 혈액생화학적 검사에서는 모든 용량군에서 예상한대로 DEN에 의한 독성 등은 관찰 되지 않았다. 하지만, 각 투여 용량군의 유전자 발현 양상을 분석하는 PCA 결과는 부형제 대조군과 각 투여 용량군 사이에서 발현 유전자군이 확연하게 다름을 보여주고 있다 (Fig. 2). 본 연구결과에서는 세포독성을 유발하지 않는 농도군에서 실험을 수행하였기 때문에 PCA 결과에 의해서 분류된 유전자군은 일반적인 세포독성을 유발하는 기작에 관련된 것이 아니라 DEN 특이적인 기작에 관여하는 유전자군인 것으로 사료된다.

부형제 대조군과 각 투여 용량군사이에서 유의성 있게 발현량이 증가한 유전자는 Student's *t*-test를 이용하여 선별하였다. False-positive를 최소한으로 하기 위하여 발현량의 차이가 적어도 2배 이상이면서 *p*-value가 0.01이하인 유전자만 선별하였다. Nakae 등은(Nakae *et al.*, 1997) DEN에 의한 DNA 손상 유발에 중요한 역할을 하는 8-OHdG의 세포내 수준이 투여 6시간 후부터 증가하기 시작한다고 보고하였다. 따라서, 시간대별로 유전자 발현 변화를 알아보기 위하여 DEN 투여 후 2, 4, 8, 24시간 후에 간을 적출하여 microarray 실험을 수행하였다. 투여용량군에서 뚜렷한 독성을 보이지 않은 것처럼 유전자 발현변화에 있어서도 부형제 대조군과 투여군 사이에 큰 차이를 보이는 유전자는 많지 않았지만, 투여 후 2시간째에 가장 많은 유전자 발현 변화가 관찰되었다. 흥미롭게도 시간이 지남에 따라 발현량에 변화를 보이는 유전자의 숫자가 줄어들면서 24시간째에는 부형제 대조군과 처리군 사이에 발현변화에서 거의 차이를 보이지 않았다. 이는 투여한 DEN의 농도범위가 독성을 유발할 만큼 고농도가 아니기 때문에 처리 후 시간이 지남에 따라 세포가 회복되고 있음을 시사한다고 할 수 있다. 초기 2시간째에 발현량이 변화된 유전자가 DEN의 초기독성에 관여하는 것으로 보인다. 따라서, 2시간째에 발현량이 크게 변화된 유전자를 대상으로 각 투여 용량군에 따른 유전자 변화를 알아보고자 hierarchical clustering 분석을 수행하였다. 변화되는 유전자군은 크게 7개 cluster로 구분이 되어서, cluster 1은 DEN에 의해서 용량증가에 따라 발현량이 감소된 유전자들을 포함하고 있고, 반대로 cluster 4, 5, 6은 부형제 대조군에 비해서 발현량이 증가된 유전자들을 포함하고 있다. 특히, Cluster 1에는 투여용량에 따라 감소하는 유전자로서 기능이 알려지지 않은 *Odz3*(Ben-Zur *et al.*, 2000)와 benign lipomas에서 유전자의 translocation에 관여하는 단백질인 lipoma-preferred partner gene인 *Lpp*(Petit *et al.*, 1996), cell division cycle 4-like protein에 대한 유전자인 *Lrba*(Wang *et al.*, 2001a) 등이 있고, cluster 5에는 투여용량에 따라 증가하는 유전자로서 MAP kinase 신호전달에 관여하는 jun proto-oncogene related gene D1에 대한 유전자인 *JunD1* (Smart *et al.*, 2006)과 조직의 분화 등에 관여하는 growth/differentiation factor 15에 대한 유전자인 *Gdf15* (Yokoyama-Kobayashi *et al.*, 1997), antineoplastic activity를 가진 basic leucine zipper 전사인자에 대한 유전자인 *Nfe2l2*(Wang *et al.*, 2001b), tumor suppressor 단백질인 p53의 조절인자로서 작용하는 단백질에 대한 유전자인 *Mdm2*(Momand *et al.*, 1992) 등이 있었다.

Hierarchical clustering 분석에 더해서 DEN 투여 2시간째에 유전자 발현증감이 가장 뚜렷했기 때문에 2시간째에 통계학적인 유의성($p < 0.01$)을 보인 유전자를 선별하였다. 특히, 다른 투여군에 비해서 20 mg/kg 투여군에서는 가장 많은 39개의 유전자가 선별되었다. 이중 growth differentiation factor의 일종인 *Gdf15*는 부형제 대조군

에 비해서 5.87배나 발현량이 증가하였고, 전사조절인자의 일종인 *Jund1*과 ubiquitin-protein ligase 활성을 가진 *Mdm2*도 3배 이상 발현량이 증가하였다. 반대로 전사조절인자인 *Sox6*(Connor *et al.*, 1995)와 serine methyltransferase 활성도를 가진 *Shmt2*(Garrow *et al.*, 1993), taurine transporter인 *Slc6a6*(Uchida *et al.*, 1992) 등은 3배 이상 발현량이 감소하였다. 3 mg/kg 투여군의 경우에도 12개 유전자, 7 mg/kg 투여군의 경우에는 29개 유전자의 발현변화가 유의성 있게 증감하는 것으로 나타났다. Heme 생합성에서 중요한 효소인(Kaasik and Lee, 2004) δ-aminolevulinate synthase에 대한 유전자인 *Alas1*(Bishop *et al.*, 1990) 유전자의 경우, 3 mg/kg 투여군에서는 물론 20 mg/kg 투여군에서도 유의성이 있는 것으로 나타났다. 또한, zinc finger gene-specific repressor element인 *Rest* 유전자(Schoenherr and Anderson, 1995)를 비롯하여 basic leucine zipper 전사인자인 *Bach1* (Oyake *et al.*, 1996), multiprotein complexes형성을 위한 scaffold로 작용하는 *Pdlim7*(Bach, 2000), glutamyl-tRNA synthetase인 *Qars* 유전자(Lamour *et al.*, 1994) 등은 7 mg/kg 투여군과 20 mg/kg 투여군에서 모두 유의성이 있는 유전자 발현 변화를 보인 것으로 나타났다.

본 실험실외에도 Waring 등(Waring *et al.*, 2001)은 Affymetrix Rat Toxicology U34 Array를 사용하여 DEN을 포함하는 15가지 간독성 유발물질에 대한 유전자발현 profile을 보고한 적이 있다. 또한, 여러 실험실에서는 DEN에 의해서 유발되는 간암에 관여하는 여러 유전자들을 보고하고 있다. Tatematsu 등(Tatematsu *et al.*, 1988)은 preneoplastic hepatocytes에 대한 marker로서 γ-glutamyl transpeptidase(GGT)를 보고하였고, Bannasch 등(Bannasch *et al.*, 1984)은 hepatocellular glycogenesis을 중요한 marker로서 보고하였다. 또한, proliferating cell nuclear antigen(PCNA)를 비롯하여 Ki-67, Mcm2, MIB1, MIA, CSE1L/CAS 단백질 등도 DEN-induced carcinogenesis에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다(Qin and Tang, 2002). 하지만 본 microarray 분석에서는 이러한 유전자들에 대한 유의성이 있는 발현 변화가 관찰되지 않았다. 이는 사용한 시험계(마우스 *vs* 랫드)의 차이와 microarray를 이용한 대량검색방법과 단일유전자 검색방법 등의 technology 등의 차이에 기인한 것으로 보인다. 따라서, 추후 연구는 기존에 보고된 간독성 유발 물질들에 대한 유전자발현 정보 등을 통합 분석하여 DEN 등에 대한 간독성 관련 유전자 발현 profile에 대한 database를 만든다면 일반적인 간독성 기작은 물론 간암으로 발전하는데 관여하는 기작에 대한 정보까지 얻을 수 있을 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 2004년도 식품의약품안전청 용역연구사업(04122유전체647; 독성유전체기술을 이용한 안전성유효성 평가기술 개발) 지원으로 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

참고문헌

Bach, I. (2000). The LIM domain: Regulation by association. *Mech. Dev.*, **91**, 5-17.

Bannasch, P., Hacker, H.J., Klimek, F. and Mayer, D. (1984). Hepatocellular glycogenosis and related pattern of enzymatic changes during hepatocarcinogenesis. *Adv. Enzyme Regul.*, **22**, 97-121.

Ben-Zur, T., Feige, E., Motro, B. and Wides, R. (2000). The mammalian Odz gene family: Homologs of a Drosophila pair-rule gene with expression implying distinct yet overlapping developmental roles. *Dev. Biol.*, **217**, 107-120.

Bishop, D.F., Henderson, A.S. and Astrin, K.H. (1990). Human δ-aminolevulinate synthase: Assignment of the housekeeping gene to 3p21 and the erythroid-specific gene to the X chromosome. *Genomics*, **7**, 207-214.

Brown, P.O. and Botstein, D. (1999). Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat. Genet.*, **21**, 33-37.

Connor, F., Wright, E., Denny, P., Koopman, P. and Ashworth, A. (1995). The Sry-related HMG box-containing gene Sox6 is expressed in the adult testis and developing nervous system of the mouse. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 3365-3372.

Driver, H.E. and McLean, A.E. (1986). Dose-response relationships for initiation of rat liver tumours by diethylnitrosamine and promotion by phenobarbitone or alcohol. *Food Chem. Toxicol.*, **24**, 241-245.

Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O. and Bostein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 14863-14868.

Fielden, M.R. and Zacharewski, T.R. (2001). Challenges and limitations of gene expression profiling in mechanistic and predictive toxicology. *Toxicol. Sci.*, **60**, 6-10.

Garrow, T.A., Brenner, A.A., Whitehead, V.M., Chen, X.-N., Duncan, R.G., Korenberg, J.R. and Shane, B. (1993). Cloning of human cDNAs encoding mitochondrial and cytosolic serine hydroxymethyltransferases and chromosomal localization. *J. Biol. Chem.*, **268**, 11910-11916.

Kaasik, K. and Lee, C.C. (2004). Reciprocal regulation of haem biosynthesis and the circadian clock in mammals. *Nature*, **430**, 467-471.

Lamour, V., Quevillon, S., Diriong, S., N'Guyen, V.C., Lipinski, M. and Mirande, M. (1994). Evolution of the Glx-tRNA synthetase family: The glutaminyl enzyme as a case of horizontal gene transfer. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 8670-8674.

LeBoeuf, R.A., Laishes, B.A. and Hoekstra, W.G. (1985).

Effects of dietary selenium concentration on the development of enzyme-altered liver foci and hepatocellular carcinoma induced by diethylnitrosamine or N-acetylaminofluorene in rats. *Cancer Res.*, **45**, 5489-5495.

Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D.L. and Levine, A.J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, **69**, 1237-1245.

Nakae, D., Kobayashi, Y., Akai, H., Andoh, N., Satoh, H., Ohashi, K., Tsutsumi, M. and Konishi, Y. (1997). Involvement of 8-hydroxyguanine formation in the initiation of rat liver carcinogenesis by low dose levels of N-nitrosodiethylamine. *Cancer Res.*, **57**, 1281-1287.

Oyake, T., Itoh, K., Motohashi, H., Hayashi, N., Hoshino, H., Nishizawa, M., Yamamoto, M. and Igarashi, K. (1996). Bach proteins belong to a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription factors that interact with MafK and regulate transcription through the NF-E2 site. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 6083-6095.

Pennie, W.D. and Kimber, I. (2002). Toxicogenomics: transcript profiling and potential application to chemical allergy. *Toxicol. In Vitro*, **16**, 319-326.

Petit, M.M.R., Mols, R., Schoenmakers, E.F.P.M., Mandahl, N. and Van de Ven, W.J.M. (1996). LPP, the preferred fusion partner gene of HMGIC in lipomas, is a novel member of the LIM protein gene family. *Genomics*, **36**, 118-129.

Qian, C., Idoate, M., Bilbao, R., Sangro, B., Bruna, O., Vazquez, J. and Prieto, J. (1997). Gene transfer and therapy with adenoviral vector in rats with diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma. *Human Gene Ther.*, **8**, 349-358.

Qin, L.X. and Tang, Z.Y. (2002). The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.*, **8**, 385-392.

Schoenherr, C.J. and Anderson, D.J. (1995). The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): A coordinate repressor of multiple neuron-specific genes. *Science*, **267**, 1360-1363.

Shivapurkar, N., Hoover, K.L. and Poirier, L.A. (1986). Effect of methionine and choline on liver tumor promotion by phenobarbital and DDT in diethylnitrosamine-initiated rats. *Carcinogenesis*, 547-550.

Smart, D.E., Green, K., Oakley, F., Weitzman, J.B., Yaniv, M., Reynolds, G., Mann, J., Millward-Sadler, H. and Mann, D.A. (2006). JunD is a profibrogenic transcription factor regulated by Jun N-terminal kinase-independent phosphorylation. *Hepatology*, **44**, 1432-1440.

Tatematsu, M., Nagamine, Y. and Farber, E. (1988). Stable phenotypic expression of glutathione S-transferase placental type and unstable phenotypic expression of γ-glutamyl transpeptidase in rat liver preneoplastic and neoplastic lesions. *Carcinogenesis*, **9**, 215-220.

Uchida, S., Kwon, H.M., Yamauchi, A., Preston, A.S., Marumo, F. and Handler, J.S. (1992). Molecular cloning of the cDNA for an MDCK cell Na(+)- and Cl(-)-dependent taurine transporter that is regulated by hypertonicity. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 8230-8234.

Wang, J.-W., Howson, J., Haller, E. and Kerr, W.G. (2001a). Identification of a novel lipopolysaccharide-inducible gene with key features of both a kinase anchor proteins and chs1/beige proteins. *J. Immunol.*, **166**, 4586-4595.

Wang, Y., Devereux, W., Stewart, T.M. and Casero, R.A. Jr. (2001b). Characterization of the interaction between the transcription factors human polyamine modulated factor (PMF-1) and NF-E2-related factor 2 (Nrf-2) in the transcriptional regulation of the spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase (SSAT) gene. *Biochem. J.*, **355**, 45-49.

Waring, J.F., Jolly, R.A., Ciurlionis, R., Lum, P.Y., Praestgaard, J.T., Morfitt, D.C., Buratto, B., Roberts, C., Schadt, E. and Ulrich, R.G. (2001). Clustering of hepatotoxins based on mechanism of toxicity using gene expression profiles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **175**, 28-42.

Williams, G.M., Iatropoulos, M.J., Wang, C.X., Ali, N., Rivenson, A., Peterson, L.A., Schulz, C. and Gebhardt, R. (1996). Diethylnitrosamine exposure-responses for DNA damage, centrilobular cytotoxicity, cell proliferation and carcinogenesis in rat liver exhibit some non-linearities. *Carcinogenesis*, **17**, 2253-2258.

Yeung, K.Y. and Ruzzo, W.L. (2001). Principal component analysis for clustering gene expression data. *Bioinformatics*, **17**, 763-774.

Yokoyama-Kobayashi, M., Saeki, M., Sekine, S. and Kato, S. (1997). Human cDNA encoding a novel TGF-β superfamily protein highly expressed in placenta. *J. Biochem.*, **122**, 622-626.