

아세트아미노펜에 의해 간손상이 유발된 랫드의 유전자 발현 분석

정희경

한양대학교 의과대학 병리학교실

Gene Expression Analysis of Acetaminophen-induced Liver Toxicity in Rat

Heekyoung Chung

Department of Pathology, College of Medicine, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

Received November 21, 2006; Accepted December 9, 2006

ABSTRACT. Global gene expression profile was analyzed by microarray analysis of rat liver RNA after acute acetaminophen (APAP) administration. A single dose of 1 g/kg body weight of APAP was given orally, and the liver samples were obtained after 24, 48 h, and 2 weeks. Histopathologic and biochemical studies enabled the classification of the APAP effect into injury (24 and 48 h) and regeneration (2 weeks) stages. The expression levels of 4900 clones on a custom rat gene microarray were analyzed and 484 clones were differentially expressed with more than a 1.625-fold difference (which equals 0.7 in log₂ scale) at one or more time points. Two hundred ninety seven clones were classified as injury-specific clones, while 149 clones as regeneration-specific ones. Characteristic gene expression profiles could be associated with APAP-induced gene expression changes in lipid metabolism, stress response, and protein metabolism. We established a global gene expression profile utilizing microarray analysis in rat liver upon acute APAP administration with a full chronological profile that not only covers injury stage but also later point of regeneration stage.

Keywords: Acetaminophen, Liver toxicity, Microarray analysis, Gene expression profiling, Toxicogenomics.

서 론

과학 기술의 발달과 산업 사회의 발전으로 인해 산업 화학 독성 물질이 증가할 뿐만 아니라, 신약, 바이오 치료제, 세포 치료제의 개발 등으로 새로운 독성 물질에 대한 노출이 증가하는 추세다. 유해 물질에 대한 생체 독성 연구 중 간 독성 연구는 신 독성 연구와 더불어 유해 물질에 대한 주요 생체 독성 연구 분야이며, 특히 외부에서 유래된 대부분의 독성 물질이 간에서 대사되므로 간 독성에

대한 연구는 매우 중요하다. 뿐만 아니라 시판되던 약물의 승인이 취소되는 경우의 대부분은 약물의 간 독성에 기인하는 바, 특이성과 민감성이 우수한 간 독성 검색 기법이 필수적이다.

효율적인 전임상 및 임상 시험을 위해 기존의 생화학, 면역화학, 병리학 및 분자생물학적 기법 외에 독성유전체학(toxicogenomics)이 최근 독성학의 보조나 대체 기법으로서의 가능성이 대두되고 있다(Lettieri, 2006). 즉, 기존의 간 독성 연구 및 생화학적 검색 기법이 가진 제한적(시간적 및 검색), 비특이적 한계성을 극복할 수 있는 기법으로 마이크로어레이(microarray)를 이용한 유전체학의 응용이 활발하게 이루어지고 있으며, 독성 물질에 의해 유발된 유전자 발현의 분석을 통해 더욱 민감하고 유용한 독성 지표의 개발 및 독성 기전의 연구가 보고된 바 있다(Nuwaysir *et al.*, 1999; Rockett and Hellmann, 2004).

아세트아미노펜(acetaminophen; APAP)은 비스테로이

Correspondence to: Heekyoung Chung, Department of Pathology, College of Medicine, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea
E-mail: hc2h@hanyang.ac.kr

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; APAP, acetaminophen; AST, aspartate aminotransferase; H&E, hematoxylin and eosin; NAPQI, N-acetyl-p-benzoquinoneimine; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction.

Table 1. Primer sequences used to validate the microarray analysis by RT-PCR

Gene	UniGene ID	Forward primer	Reverse Primer
Hamp	Rn.7865	taggacaggaataaataatggg	cagaagcaagactgatgacag
Adh1	Rn.756	aaagcttgacagggtgcttt	gcacctggaaggagcaata
Tpt1	Rn.36610	aacaatgcctcactcctcaaa	gctgcagagcaaattaagca
Rbp1	Rn.902	gactctgtggcagaaacct	aggcatagatgaccgcaagt
Ccl5	Rn.8019	agcctgtgaagagcacacct	gtgcccacgtgaaggagtat
Gapdh	Rn.91450	cggagtcaacggattgtgctgat	agccttctcatggttggtgaagac

드게 항염증성 물질의 일종으로, 체내에서 cytochrome P450 isoforms에 의해 반응성이 매우 높은 N-acetyl-p-benzoquinoneimine(NAPQI)으로 대사된다. 치료용의 낮은 APAP 농도에서는 glutathione(GSH)과 결합을 통해 대사되어 무해하나(Mitchell *et al.*, 1973), 고농도의 APAP에 노출될 경우 GSH가 소진되어 NAPQI가 단백질의 시스테인 잔기에 공유결합함으로써 미토콘드리아의 손상과 ATP 합성의 억제가 일어나 세포가 손상되는 것으로 알려져 있다(Farber, 1973; Pumford *et al.*, 1997). 최근 NAPQI 이외에 산화질소와 그 산화물에 의한 간 조직의 괴사가 보고된 바 있다 (Knight *et al.*, 2002).

마이크로어레이 기법을 이용한 랫드에서의 APAP의 급성 간 독성을 연구한 보고는 최근 몇 편 있으나(Heinloth *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2004; Minami *et al.*, 2005), 단회 투여 후 최대 72시간까지만 관찰하여 독성이 일어날 때의 유전자 발현 변화만을 보았다. 본 연구에서는 랫드에 APAP를 1 g/kg body weight로 투여한 후 24, 48시간 후의 손상(injury)을 보고, 2주 후의 재생(regeneration) 상태까지 관찰하여, APAP에 의한 손상기-재생기 모델을 확립 하였을 뿐만 아니라 각 단계에서의 유전자 발현 변화를 조사함으로써 손상기 특이적, 재생기 특이적 유전자를 선별하였다. 더불어 기존에 보고된 유전자의 발현 양상 외에 단백질 대사나 스트레스에 반응하는 유전자의 변화를 보았다.

재료 및 방법

실험동물의 처리

5주령의 Sprage-Dawley 랫드를 구입하여(Orient; Seoul, Korea) 한양대학교 의과대학 실험동물실의 SPF 시설에서 1주간 순화한 후 5마리를 한 군으로 하여 1 g/kg body weight의 APAP(Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, U.S.A.)를 경구 투여했다. 실험동물은 IACUC 및 AAALAC의 실험동물 취급 규정을 준수하였다. 투여량은 LD₅₀(2.4 g/kg body weight)의 약 0.4배에 해당하며, 투여 후의 시간 중 24, 48시간은 기존 문헌에 준하고(Heinloth *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2004; Minami *et al.*, 2005), 2주는 임의

로 결정하였다. 희생 즉시 말초 혈액을 채취하고, 간 조직을 적출하였다.

혈청 생화학 및 조직 병리학적 분석

혈청 생화학적 분석으로 alanine aminotransferase (ALT)와 aspartate aminotransferase(AST)의 활성을 측정하였다. 조직 병리학적 분석은 간 조직 절편의 H&E 염색을 통해 관찰하였다. 자세한 방법은 기존 문헌을 따랐다(Chung *et al.*, 2005b).

마이크로어레이 분석

다섯 마리의 한 군당 혈청 생화학 및 조직 병리학적 분석을 통해 일관된 결과를 보여준 세 마리의 간 조직으로부터 total RNA를 추출한 후 혼합하여(pooled), 조건 당 6회의 잡종화(hybridization)를 실시하였다. RNA 추출, rat custom cDNA chip, 형광표지 탐식의 방법, 잡종화, 마이크로어레이 분석법 등은 기존의 방법과 동일하다(Chung *et al.*, 2005a).

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

반응에 사용된 프라이머의 염기서열은 Table 1에 있으며, 사용한 제재와 조건은 기존의 방법과 동일하다(Chung *et al.*, 2005a).

결과 및 고찰

마이크로어레이 결과의 확인

하나의 칩에 동일 유전자가 반복적으로 혹은 동일 유전자의 다른 cDNA 부위가 접종된 경우, 잡종화 이후의 값이 internal control로 사용될 수 있다. 칩에서의 위치 (Spot ID)가 상이하더라도 마이크로어레이 결과가 비슷하게 나온 유전자로 parvalbumin(Pvalb, Rn.2005; 24시간, 48시간, 2주의 값이 Spot ID 1496의 경우 -0.469, -0.990, -0.558; Spot ID 2270의 경우 -0.597, -0.930, -0.382), biglycan(Bgn, Rn.783; Spot ID 345, 0.272, 1.014, -0.567; Spot ID 3457, 0.288, 1.289, -0.454), 4-hydro-

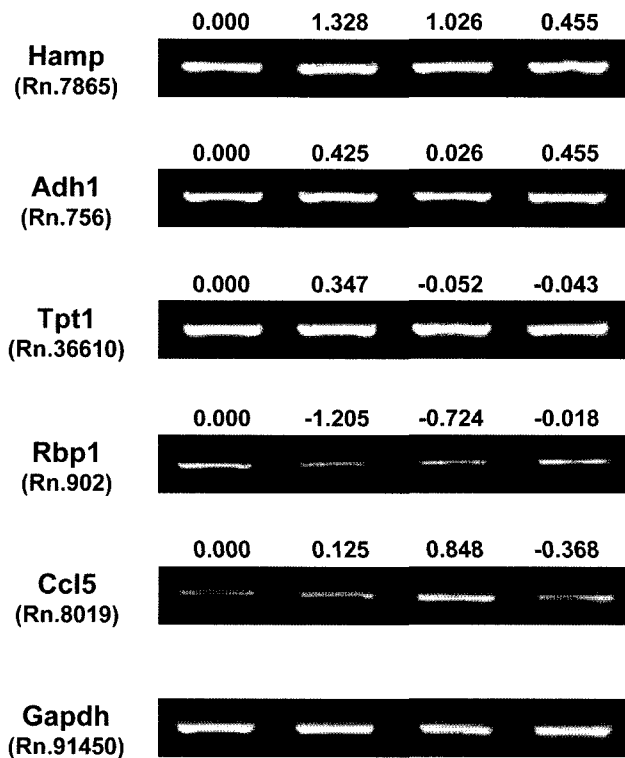


Fig. 1. Semi-quantitative RT-PCR and microarray results of selected clones. Fold changes in log₂ scale from microarray analysis were illustrated above the semi-quantitative RT-PCR results. Each probe was presented by its gene symbol (left to the panel) and the corresponding UniGene Cluster ID numbers were parenthesized. Numbers shown above the RT-PCR result were microarray data of the indicated genes which were represented as fold change (in log₂ value) versus the non-treated control. From left to right: non-treated, 24 h, 48 h, 2 w.

xyphenylpyruvic acid dioxygenase(Hpd, Rn.3664; Spot ID 3733, -0.442, -0.161, 0.404; Spot ID 986, -0.553, -0.230, 0.411) 등이 있다. 또 다른 확인 방법으로 RT-PCR를 들 수 있는데, 임의로 선별한 몇 개 유전자에 대한 결과는 Fig. 1에서 볼 수 있듯 높은 상관관계를 보였다.

APAP에 의한 간 독성의 손상-재생 모델 확립

조직 병리학적 분석 결과 APAP 투여 후 24 및 48시간에 염증세포의 침윤 및 간 세포의 괴사를 관찰되었고, 2주에는 이런 현상이 뚜렷이 호전되어 비투여 대조군과 유사하였다(Fig. 2). ALT와 AST의 변화도 24 및 48시간에 만 약하게 관찰되었고, 2주에는 정상 수준으로 낮아졌다(data not shown). 이와 같은 관찰 결과를 토대로 APAP 투여 후 24, 48시간은 손상기, 2주 후는 재생기로 구분할 수 있었다.

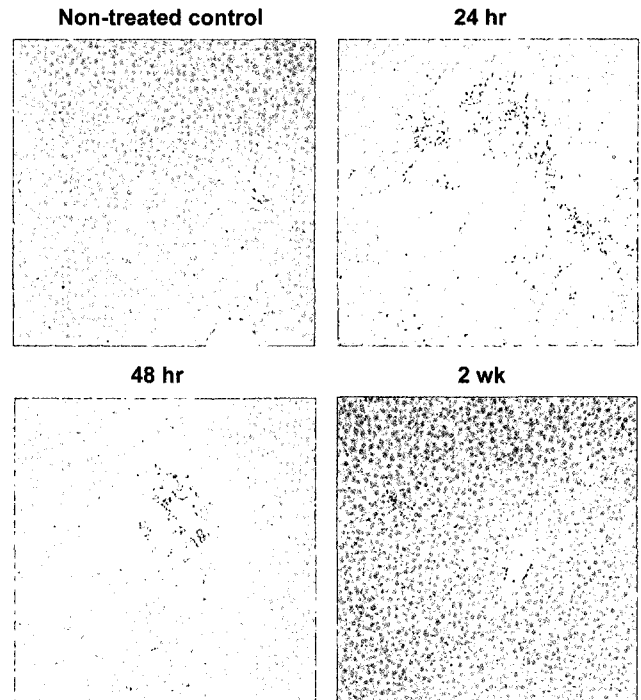


Fig. 2. Sequential histopathologic changes of rat liver treated with 1 g/kg body weight APAP (H&E, x 400). Sections from non-treated liver showed normal histology, while those treated with APAP showed spotty necrosis of hepatocytes with lymphocyte infiltration at 24 and 48 h, and recovery at 2 w.

손상기 및 재생기 특이적 유전자 발현

비 투여 대조군과의 fold change를 log₂의 값으로 변환하였을 때 그 절대값이 0.7 이상(1.625배)인 경우만을 특이적으로 발현한 것으로 정의하였다. 손상기와 재생기 특이적 유전자는 기존 문헌과 동일한 방법으로 선별하였으며(Chung *et al.*, 2005a), 각각 297개와 149개였다. 297개 clone 중 169개는 손상기에 그 발현이 감소하였으나, 128개는 증가하였다. 손상기에 감소한 유전자에는 solute carrier family (Slc)의 일종인 Slc2a2(Rn.89295), Slc10a1(Rn.9913), Slc27a2(Rn.3608), 세포 부착(adhesion)에 관여하는 syndecan 2(Sdc2, Rn.11127), fibronectin 1(Fn1, Rn.1604), CD44 antigen(Cd44, Rn.1120) 등이 포함된다. 손상기에 증가한 유전자에는 다수의 리보솜 단백질, 염증반응에 관여하는 macrophage migration inhibitory factor(Mif, Rn.2661), glutathione peroxidase 4(Gpx4, Rn.3647), chemokine(C-C motif) ligand 5(Ccl5, Rn.8019), ATP 대사에 관여하는 ATPase inhibitor(Atpif1, Rn.1658), ATP synthase, H transporting, mitochondrial F1 complex, epsilon subunit(Atp5e, Rn.3454) 등이 있다. 재생기의 특이 유전자 중 114개는 그 발현이 감소하였고,

Table 2. Genes that can be classified as both injury- and regeneration-specific genes

UGCluster	Name	24 h	48 h	2 w
Rn.54394	Kng1	-0.095	-0.849	2.488
Rn.17029	R. norvegicus transcribed sequence	-0.774	0.385	1.431
Rn.223	Pcna	-0.549	-0.786	1.017
Rn.1716	Il6ra	-0.843	0.361	1.115
Rn.11308	Itih4	-0.658	-0.878	1.380
Rn.3661	Gyg1	-0.581	-0.947	1.152
Rn.32777	Cp	-0.684	-0.811	1.066
Rn.11414	Cd38	-0.411	-0.833	2.344
Rn.10252	C9	-1.106	-0.204	1.160
Rn.10624	R. norvegicus transcribed sequence	1.804	2.012	-1.256
Rn.74071	R. norvegicus transcribed sequence	0.402	1.276	-0.732
Rn.17156	R. norvegicus transcribed sequence	-0.347	1.147	-1.024
Rn.119282	R. norvegicus transcribed sequence	0.884	1.151	-0.725
Rn.2661	Mif	1.089	1.436	-1.014
Rn.625	Gstm1	0.247	0.840	-0.704
Rn.40574	LOC494499	1.952	2.212	-1.088
Rn.2460	Gclm	0.812	-0.021	-1.479
Rn.97126	Alas1	-0.633	0.805	-1.186
Rn.100569	Fkbp11	-0.193	0.974	-0.889
Rn.3786	Acaa2	0.661	0.837	-1.352
Rn.3786	Acaa2	0.424	0.806	-1.350

Each value represents the fold change (in log2 value) vs. the non-treated control.

45개는 증가하였다. 재생기에 감소한 유전자로 carrier의 활성을 가진 transthyretin(prealbumin, amyloidosis type I; Ttr, Rn.1404), solute carrier family 21(organic anion transporter), member 5(Slco1a4, Rn.5641), solute carrier family 17 vesicular glutamate transporter), member 1(Slc17a1, Rn.11150), kynurenine 3-hydroxylase(Kmo, Rn.35029), DNA 손상 반응에 관여하는 macrophage migration inhibitory factor(Mif, Rn.2661), heme oxygenase(Hmox1, Rn.3160) 등이 있다. 재생기에 발현이 증가한 유전자 중 조직의 재생에 관여하는 fibrinogen, A alpha polypeptide(Fga, Rn.5500)과 DNA 복제를 조절하는 proliferating cell nuclear antigen (Pcna, Rn.223) 등이 있다(Sobczak *et al.*, 1987; Chanda *et al.*, 1995). 손상기와 재생기에 모두 특이적인 유전자는 21개였다(Table 2).

Cytochrome P450 유전자 군의 발현 변화

APAP의 대사에서 cytochrome P450 효소의 작용이 매우 중요하며(Potter *et al.*, 1973), 주요 대사체인 NAPQI는 CYP2E, CYP3A 및 CYP1A2에 의해 생성된다(Sinclair *et al.*, 1998). 본 연구에서는 CYP1A2의 발현이 손상기의 두 시간대에서 모두 감소하였으나, 나머지 두 유전자의 발현은 확인할 수 없었다. Cyp1a2 유전자가 인위적으로 손상된 knockout 생쥐[Cyp2d(-/-)]는 wild type에 비해 APAP에 의한 간 손상에 더 저항성을 가지는 것

으로 보고된 바 있는데(Liang *et al.*, 1996), 본 연구에서 관찰된 Cyp1a2 유전자의 발현 감소는 간 세포의 파괴를 최소화 하기 위한 세포의 생존전략이라 생각할 수 있다. 보고된 세 가지 CYP 유전자 외에 여러 CYP 유전자의 발현 변화를 볼 수 있었는데, Cyp4b1(Rn.86651)는 재생기에 발현이 늘어난 반면, Cyp27a1(Rn.94956), Cyp2d22(Rn.26060), Cyp2c7(Rn.1247) 등은 손상기에, Cyp2b3(Rn.4845)와 Cyp51(Rn.6150)는 재생기에 발현이 낮았다.

Stress에 대한 반응에 관여하는 유전자 군의 발현 변화

본 연구에서 사용된 APAP에 의해 간 세포에서 다수의 스트레스 관련 유전자의 발현 변화가 나타났다. 산화적(oxidative) 스트레스에 의해 발현이 조절되는 것으로 알려진 carbonic anhydrase 3(Ca3, Rn.1647)의 발현이 손상기에서 낮았다. Glutathione peroxidase(Gpx) 중 Gpx1(Rn.11323)의 발현이 손상기에 낮았는데, 이는 APAP를 처리한 간 세포주에서의 단백질체학(proteomics) 결과와 일치하였다(Yamamoto *et al.*, 2005). 그러나 Gpx4(Rn.3647)의 발현은 손상기 중 48시간에 증가하였고, Gpx3은 발현 변화가 없었다. 역시 산화적 스트레스에 의해 발현이 조절되는 것으로 알려진 peroxiredoxin 1(Prdx1, Rn.2845)의 발현이 손상기의 24시간에 증가하였는데, 간 세포주에 APAP를 처리하여 단백질체학으로 확인한 문헌과 그 결과가 일치하였으며(Yamamoto *et al.*, 2005), peroxiredoxin 6(Prdx6, Rn.42)의 발현도 같은 시간대에 증가하였다. 한

편 heat stress에 의해 발현이 조절되는 것으로 알려진 crystallin, alpha B(Cryab, Rn.54554)의 경우, APAP 처리 시 손상기의 48시간에 그 발현이 감소하는 것으로 나타났다. Heat stress를 받은 랫드의 간에서 Cryab의 단백질 발현이 증가하나, 에탄올로 전 처리한 후 heat stress를 주면 Cryab 단백질이 증가하지 않은 것으로 보아(Inaguma *et al.*, 1995), 간 손상을 일으키는 물질에 의해 Cryab의 발현이 음성적으로 조절되는 것으로 유추할 수 있다. 그러나 caspase의 활성화에 필수적인 cytochrome c, somatic (Cycs, Rn.2202)이나 아포토시스(apoptosis) 과정 중의 DNA 분절에 관여하는 superoxide dismutase(Sod1, Rn.6059)는 APAP에 의해 발현 변화가 없었다.

대사(metabolism) 관련 유전자 군의 발현 변화

다양한 농도의 APAP로 간 독성을 유발하였을 때 투여 후 48시간 동안에는 에너지를 소모하는 생화학적 경로의 유전자 발현이 감소하는 반면, 에너지를 생산하는 생화학적 경로의 유전자 발현이 증가하는 것으로 보고된 바 있다(Heinloth *et al.*, 2004). 본 연구에서는 단백질 합성에 필수적인 리보솜의 구성 단백질들의 발현이 손상기 중에서도 특히 24시간에 증가하는 것을 관찰 하였다. 리보솜의 대 단위체(large subunit)를 구성하는 Rpl6(Rn.2660), Rpl4(Rn.1133), Rpl36(Rn.1439), Rpl35a(Rn.2812), Rpl29(Rn.3973), Rpl13(Rn.908), Rpl10a(Rn.2262)와 리보솜 소 단위체(small subunit)를 구성하는 Rps8(Rn.3198), Rps24(Rn.979), Rps21(Rn.4153), Rps2(Rn.2115), Rps15a(Rn.2890), Rps15(Rn.3391), Rps13(Rn.4609), Rps11(Rn.2177)의 발현이 증가하였다. 이와 같은 리보솜 구성 단백질의 발현 변화는 사염화탄소(carbon tetrachloride)에 의한 급성 간 독성에서도 보고된 바 있으며(Chung *et al.*, 2005a), 독성에 대한 간 세포의 방어기전의 일부로 생각된다. 한편 단백질의 분해에 관여하는 유전자의 발현 변화도 관찰되었는데 ubiquitin C(Ubc, Rn.3761)의 발현은 손상기의 48시간에 감소하였으나, 프로테아솜 소단위체(proteasome subunit, Ps)인 Psma1(Rn.2668), Psma4(Rn.11076), Psmb3(Rn.232)의 발현은 손상기의 24시간에 모두 증가하였다. 지방산(fatty acid)의 대사에 관여하는 유전자 중(fatty acid Coenzyme A ligase, long chain 2(Acsl1, Rn.6215)는 손상기의 24시간에 감소하였으나, Fatty acid binding protein 1, liver(Fabp1, Rn.36412)는 재생기에 감소하였고, solute carrier family 27(fatty acid transporter), member 1(Slc27a1, Rn.1047)은 재생기에 증가하였다. 콜레스테롤의 대사에 관여하는 유전자 중 steroidogenic acute regulatory protein(Star, Rn.11399)은 손상기의 24시간에 발현이 증가하였으나,

apolipoprotein A-I(Apoa1, Rn.10308)과 apolipoprotein A-IV(Apoa4, Rn.15739)의 발현은 재생기에 감소하였고, apolipoprotein B(Apob, Rn.33815)나 apolipoprotein E(Apoe, Rn.32351)의 발현은 변화가 없었다.

지금까지 APAP를 단회 투여하여 확립한 랫드의 손상기-재생기 모델에서의 유전자 발현 변화를 보고하였다. 손상기와 재생기에 각각 특이적으로 변화하는 유전자를 선별하였으며, cytochrome P450 유전자 군, 스트레스 반응에 관여하는 유전자 군, 단백질 및 지질의 대사에 관여하는 유전자 군에 특이적인 발현 변화가 있음을 보았다. 향후 고밀도의 유전자 칩을 이용하고, 다수의 독성 물질에 대한 연구를 수행함으로써 APAP 독성에 대한 특이 지표를 결정할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2003년 한양대학교 교내연구비 지원으로 연구되었음.

참고문헌

- Chanda, S., Mangipudy, R.S., Warbritton, A., Buccì, T.J. and Mehendale, H.M. (1995): Stimulated hepatic tissue repair underlies heteroprotection by thioacetamide against acetaminophen-induced lethality. *Hepatology*, **21**, 477-486.
- Chung, H., Hong, D.-P., Jung, J.-Y., Kim, H.-J., Jang, K.-S., Sheen, Y.-Y., Ahn, J.-I., Lee, Y.-S. and Kong, G. (2005a): Comprehensive analysis of differential gene expression profiles on carbon tetrachloride-induced rat liver injury and regeneration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **206**, 27-42.
- Chung, H., Hong, D.P., Kim, H.J., Jang, K.S., Shin, D.M., Ahn, J.I., Lee, Y.S. and Kong, G. (2005b): Differential gene expression profiles in the steatosis/fibrosis model of rat liver by chronic administration of carbon tetrachloride. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **208**, 242-254.
- Farber, E. (1973): ATP and cell integrity. *Fed. Proc.*, **32**, 1534-1539.
- Heinloth, A.N., Irwin, R.D., Boorman, G.A., Nettesheim, P., Fannin, R.D., Sieber, S.O., Snell, M.L., Tucker, C.J., Li, L., Travlos, G.S., Vansant, G., Blackshear, P.E., Tennant, R.W., Cunningham, M.L. and Paules, R.S. (2004): Gene expression profiling of rat livers reveals indicators of potential adverse effects. *Toxicol. Sci.*, **80**, 193-202.
- Huang, Q., Jin, X., Gaillard, E.T., Knight, B.L., Pack, F.D., Stoltz, J.H., Jayadev, S. and Blanchard, K.T. (2004): Gene expression profiling reveals multiple toxicity endpoints induced by hepatotoxicants. *Mutat. Res.*, **549**, 147-167.
- Inaguma, Y., Hasegawa, K., Goto, S., Ito, H. and Kato, K. (1995): Induction of the synthesis of hsp27 and alpha B crystallin in tissues of heat-stressed rats and its suppression by ethanol or an alpha 1-adrenergic antagonist. *J. Biochem. (Tokyo)*, **117**, 1238-1243.
- Knight, T.R., Ho, Y.S., Farhood, A. and Jaeschke, H. (2002):

- Peroxynitrite is a critical mediator of acetaminophen hepatotoxicity in murine livers: protection by glutathione. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **303**, 468-475.
- Lettieri, T. (2006): Recent applications of DNA microarray technology to toxicology and ecotoxicology. *Environ. Health Perspect.*, **114**, 4-9.
- Liang, H.C., Li, H., McKinnon, R.A., Duffy, J.J., Potter, S.S., Puga, A. and Nebert, D.W. (1996): Cyp1a2(-/-) null mutant mice develop normally but show deficient drug metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 1671-1676.
- Minami, K., Saito, T., Narahara, M., Tomita, H., Kato, H., Sugiyama, H., Katoh, M., Nakajima, M. and Yokoi, T. (2005): Relationship between hepatic gene expression profiles and hepatotoxicity in five typical hepatotoxicant-administered rats. *Toxicol. Sci.*, **87**, 296-305.
- Mitchell, J.R., Jollow, D.J., Potter, W.Z., Gillette, J.R. and Brodie, B.B. (1973): Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **187**, 211-217.
- Nuwaysir, E.F., Bittner, M., Trent, J., Barrett, J.C. and Afshari, C.A. (1999): Microarrays and toxicology: the advent of toxicogenomics. *Mol. Carcinog.*, **24**, 153-159.
- Potter, W.Z., Davis, D.C., Mitchell, J.R., Jollow, D.J., Gillette, J.R. and Brodie, B.B. (1973): Acetaminophen-induced hepatic necrosis. 3. Cytochrome P-450-mediated covalent binding *in vitro*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **187**, 203-210.
- Pumford, N.R., Halmes, N.C. and Hinson, J.A. (1997): Covalent binding of xenobiotics to specific proteins in the liver. *Drug. Metab. Rev.*, **29**, 39-57.
- Rockett, J.C. and Hellmann, G.M. (2004): Confirming microarray data—is it really necessary? *Genomics.*, **83**, 541-549.
- Sinclair, J., Jeffery, E., Wrighton, S., Kostrubsky, V., Szakacs, J., Wood, S. and Sinclair, P. (1998): Alcohol-mediated increases in acetaminophen hepatotoxicity: role of CYP2E and CYP3A. *Biochem. Pharmacol.*, **55**, 1557-1565.
- Sobczak, J., Lotti, A.M., Taroux, P. and Duguet, M. (1987): Molecular cloning of mRNA sequences transiently induced during rat liver regeneration. *Exp. Cell. Res.*, **169**, 47-56.
- Yamamoto, T., Kikkawa, R., Yamada, H. and Horii, I. (2005): Identification of oxidative stress-related proteins for predictive screening of hepatotoxicity using a proteomic approach. *J. Toxicol. Sci.*, **30**, 213-227.