



페닐부타존에 의해 간손상이 유발된 생쥐의 유전자 발현 분석

이은주¹ · 정인해¹ · 김한나¹ · 정희경² · 공구² · 강경선³ · 윤병일⁴ · 이병훈⁵ · 이미옥⁵ · 김주한⁶ · 김형래¹
¹이화여자대학교 의과대학 생화학교실, ²한양대학교 의과대학 병리학교실, ³서울대학교 수의과대학 수의공중보건학과, ⁴강원대학교 수의학과, ⁵서울대학교 약학대학, Bio-MAX 연구소, ⁶서울대학교 의과대학 biomedical informatics(SNUBI)

Gene Expression Analysis of Phenylbutazone-induced Liver Damage in Mice

Eun-Ju Lee¹, In-Hye Jeong¹, Han-Na Kim¹, Heekyoung Chung², Gu Kong², Kyung-Sun Kang³,
Byung-IL Yoon⁴, Byeong Hoon Lee⁵, Mi-Ock Lee⁵, Ju Han Kim⁶ and Hyung-Lae Kim¹

¹Department of Biochemistry, College of Medicine, Ewha Womans University, Seoul 158-710

²Department of Pathology, College of Medicine, Hanyang University, Seoul 133-197

³Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742

⁴Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Kangwon 200-701

⁵College of Pharmacy and Bio-MAX Institute, Seoul 151-742

⁶Seoul National University Biomedical Informatics (SNUBI),
Seoul National University College of Medicine, Seoul 110-799, Korea

Received April 20, 2006; Accepted May 12, 2006

ABSTRACT. The KFDA (Korea Food & Drug Administration) has performed a collaborative toxicogenomics project since 2003. Its aim is to construct a toxicogenomic database of 12 hepatotoxic compounds from mice livers. Phenylbutazone which is non-steroidal anti-inflammatory drug was assigned. It was administered at low (0.0238 mg/kg) and at high (0.238 mg/kg) dose (5 mice per group) orally to the postnatal 6 weeks ICR mice, then the serum and liver were collected at the indicated time (6, 24 and 72 h) after administration. Serum biochemical markers for liver toxicity were measured and histopathologic studies also were carried out. The gene expression profiling was carried out by using Applied Biosystems 1700 Full Genome Expression Mouse. The 2-way ANOVA was used to find genes that reflected phenylbutazone-induced acute toxicity or dose-dependant changes. By self-organization maps (SOM), we identified groups with unique gene expression patterns, some of them are supposed to be related to phenylbutazone induced toxicity, including lipid metabolism abnormality, oxidative stress, cell death and cytoskeleton destruction.

Keywords: Phenylbutazone, drug toxicity, microarray analysis, gene expression profiling.

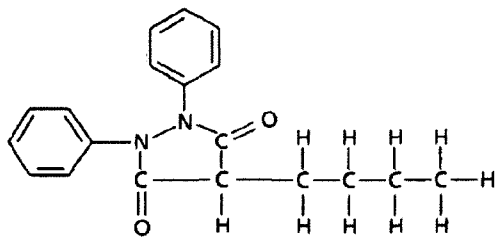
서 론

2005년 식품의약품안전청(KFDA)은 TGRC(Toxico-Genomics Research Consortium)를 기획 하였고, 6팀이 이 컨소시엄에 참여하여 간독성을 유발하는 12 약물에 의해 유발되는 급성 독성 데이터베이스 구축하고자 하였으며,

Correspondence to: Hyung-Lae Kim, Department of Biochemistry, College of Medicine, Ewha Womans University, Seoul 158-710, Korea
E-mail: hyung@ewha.ac.kr

본 실험실에서는 phenylbutazone에 대하여 급성 독성 실험 기준에 맞추어 실험을 실시하였다.

우리가 선택한 약물 중 하나인 phenylbutazone(Fig. 1)은 1914년 처음 합성된 피라졸 유도체이며, 비스테로이드계 항염증성 물질이다. 주로 항염증 작용에 효과적인 oxphenbutazone과 γ -hydroxyphenylbutazone으로 간에서 완벽하게 대사되며, 용액에서 대부분 diketo form으로 존재하지만, enol, mesomeric anion의 형태로 변환되어 나타나기도 한다(Faigle and Dieterle, 1977). 이러한 변환에 의해 phenylbutazone은 화학적으로 불안정하게 되



PHENYLBUTAZONE

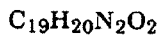


Fig. 1. Phenylbutazone structural and chemical formula.

고, peroxide 의존적 cooxygenation 반응을 통해 4-hydroxyphenylbutazone 대사산물을 만들 수 있게 한다. 또한, prostaglandin H synthase와 prostacyclin synthase 수준에서 arachidonic acid 경로를 억제하여, prostaglandin과 thromboxane의 생성을 감소시킨다(Reed *et al.*, 1985). 중 장년층에 투여 시 재생 불량성 빈혈(Fowler, 1967)이, 젊은 사람들에서는 과립구 감소증 등의 부작용이 많이 나타나기 때문에 제한되었다(Gilman *et al.*, 1985). 또한 급성 심부전으로 체액의 정체, 위장관의 궤양에 의한 소화 불량(Arai *et al.*, 1985)을 야기하는 등 주로 골수와 신장에 부작용이 나타난다.

간은 약물과 독소를 생체 내에서 변화시키는 역할을 하지만, 그 대사물로 인해 손상을 받는다(Kaplowitz *et al.*, 1986). 600여 이상의 약물들은 간에 손상을 일으키는 원인이 되고, 실질적으로 다양한 간 질환을 일으킬 수 있다. 그러나 약물에 의한 간 손상 기전은 몇몇 약품에서만 조사되어 있을 뿐 잘 알려지지 않았다(Zimmerman, 1978). 간 독성을 유발하는 물질들은 지방간, 면역매개반응, 담즙관의 손상, 섬유증과 간경변증, 종양 등 주로 4가지로 분류할 수 있으며(Casarett and Doull's Toxicology, sixth edition), 그 중 phenylbutazone은 면역매개반응을 통해 골수와 신장에 손상을 주지만 간에도 손상을 주는 것으로 알려져 있다.

Phenylbutazone에 의해 유발된 독성연구는 기존의 임상 검사, 체중, 조직학적 검사 등을 통해 여러 논문에서 보고된바 있다(Lees *et al.*, 1987; MacAllister *et al.*, 1993). 그러나, 이러한 방법은 현저한 독성변화가 있는 경우에 매우 효과적이지만, 적은 양의 독성에 의한 변화의 관측이나 예측에는 효율적이지 못하다. 따라서, 적은 양의 독성에 의한 변화나 복합적인 특성을 나타내는 독성에 의한 유전자 발현 변화를 밝히는데 고밀도 유전자 칩이 가장 강력한 도구(Schena *et al.*, 1995)이다.

우리는 6주령 ICR 생쥐에 각각 LD₅₀의 1/1000(0.238

mg/kg), 1/10000(0.0238 mg/kg)의 농도로 단일 처치하였으며, 급성 독성의 기준에 맞춰 실험을 실시한 후, 고밀도 유전자 칩을 이용하여, 급성 간 독성과 관련한 유의미한 유전자 군을 선별하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물의 처리

5주령의 SLC-ICR 숫컷 생쥐를 구입하여 한양대학교 실험동물시설(SPF시설)에서 GLP규정에 따라 사육하였으며, 실험에 사용하기 전 1주 동안의 적응기간을 두었다. 물과 사료는 자유로이 공급하였으며, 기타 실험동물의 관리에 관한 사항은 IACUC 및 AAALAC의 실험동물 취급규정을 준수하였다. 실험 시 6주령으로 5마리를 한 군으로 하였으며, 투여하기 12시간 전에 절식하고 투여 2시간 후 다시 사료를 공급하였으며 음수는 자유로이 공급하였다. 옥수수 오일에 녹인 phenylbutazone을 LD₅₀의 1/1000(0.238 mg/kg)과 1/10000(0.0238 mg/kg) 용량으로 1회 경구 투여 후 6, 24, 72시간째 희생한다. 희생 즉시 말초혈액을 채취하고, 간 조직을 적출 하였다.

생화학 및 병리 조직학적 분석

채취한 말초혈액을 3000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 혈청을 분리하고 -70°C에 보관하였다. 자동혈청생화학 분석기(Prestige 24i, Tokyo Boeki Medical System)를 이용하여 혈청 내 alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST)를 측정하였다. 적출된 간 조직은 5% 포르말린 용액에 고정하였고, 간 조직을 수세하여 탈수하고 파라핀에 포매한 후 3~5 μm 두께로 박절하였다. Xylene을 이용하여 파라핀을 제거한 후 hematoxyline/eosine 염색을 표준 방법에 따라 실시하였고 현미경으로 표본에 대해 전 시야를 관찰하였다.

Microarray 분석

적출한 간 조직을 0.5 cm 크기로 잘라서 RNAlater에 담근 후 4°C에서 overnight 보관한 뒤 RNAlater를 제거하고 -80°C로 옮겼다. 혈청과 조직검사 후 각각의 처치군에서 간병변이 최소이고 일관된 결과를 보이는 3마리의 간 조직을 선별하였으며, 각각 0.5 g의 간 조직을 막자와 사발을 이용하여 액체 질소에 담근 상태에서 가루가 될 때까지 갈아 부수고 조직을 액체 질소로 차갑게 만든 튜브로 옮긴 뒤 Trizol을 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 각각의 total RNA는 Qiagen RNeasy mini kit에서 사용하는 방법을 따라 엄격히 정제하였다. 유전자 칩은 32,000개의 유전자가 실려 있는 AB 1700 Full Genome

Expression Mouse Microarray를 사용하여 처치군당 3 번의 실험을 지시된 방법에 따라 엄격히 적용하여 실시하였다.

Reverse Transcriptase(RT)-PCR

1 μ g의 RNA, 0.5 μ g의 oligo(dT)(Intron, 한국), 증류수를 첨가하여 65°C에서 5분간 변성시킨 후 5 \times RB buffer (250 mM Tris-HCl(pH 8.3)), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 10 mM dNTP, 0.4 μ l RNase inhibitor, 100 units AMV 역전사 효소를 첨가하여 총량을 20 μ l로 하였다. 각각의 시료를 42°C에서 60분간 반응시킨 후 75°C에서 5분간 열을 가하여 반응을 종결시킨 다음 PCR 과정을 수행하였다. PCR 반응액은 전체 부피 20 μ l가 되도록 하며 10 \times Taq polymerase buffer(500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl(25°C에서 pH 9.0), 1.0%

Triton X-100, 25 mM MgCl₂, 100 pM primers, 1 units Taq polymerase(Takara)에 cDNA 1 μ l을 잘 섞었다. PCR은 thermal cycler를 이용해 pre-PCR 과정으로 94°C 2분, denaturation; 95°C 30s, annealing; 45°C~60°C 30s, extension; 72°C 30 s을 1 cycle로 하여 35 cycle, post-PCR 과정으로 72°C에서 10분 반응시켰다. 이때 사용된 primer 서열은 Table 3에 나열하였다. Ethidium bromide가 포함된 1% agarose gel에서 전기 영동을 하여 PCR 산물을 확인하였다.

생물정보학적 분석(Bioinformtics analysis)

Applied Biosystems Expression System 프로그램에서 권유하는 표준에 맞추어 유전자 칩 이미지에서 Flag 값이 100 이하이고, Signal/SDEV 비율이 4 이상인 유전자를 선택하였다. 선택한 유전자의 Non-biological factors

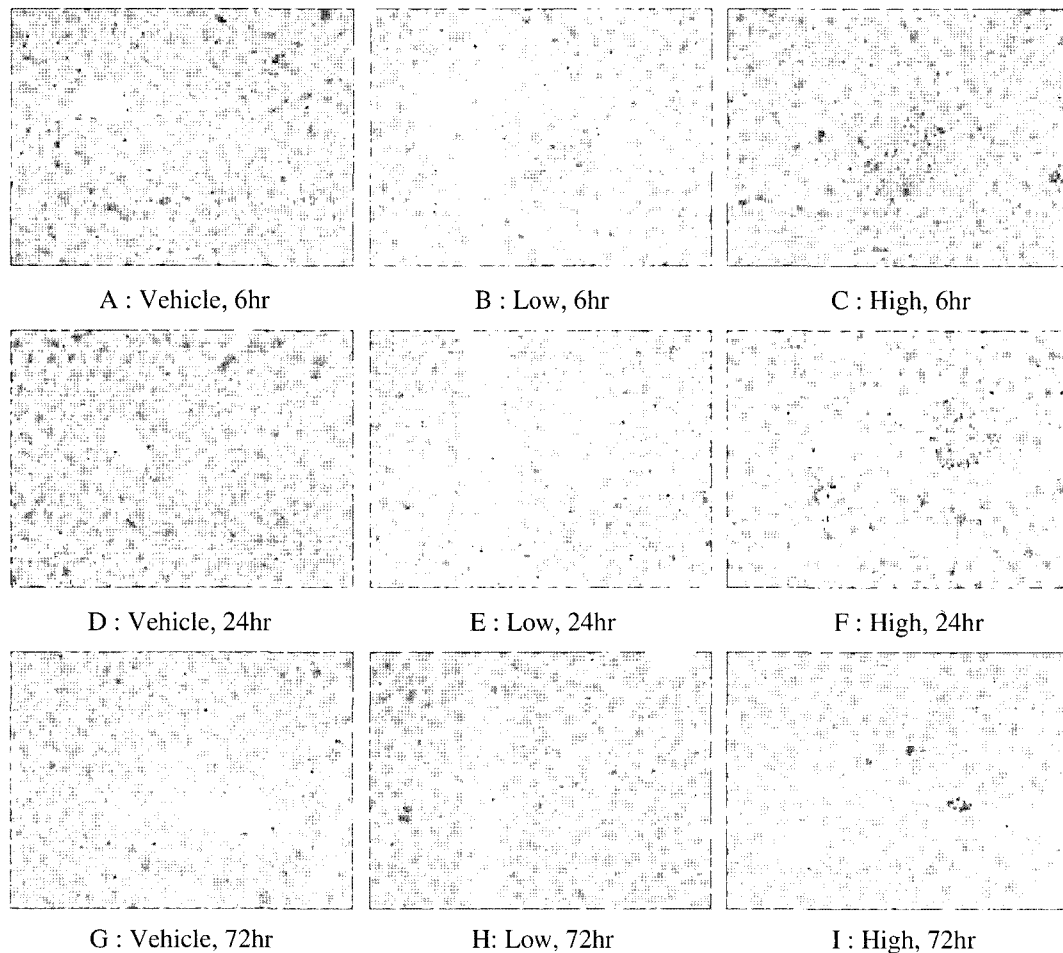


Fig. 2. Histopathologic analysis of livers from a control (vehicle) mice and mice treated with phenylbutazone. H&E staining 100 \times . (A, D, G) control liver (B, E, H) Liver tissue of 2.38 μ g/kg phenylbutazone-treated mice respectively 6 h, 24 h and 72 h after administration. (C, F, I) Liver tissue of 23.8 μ g/kg phenylbutazone-treated mice, respectively 6 h, 24 h and 72 h after administration.

를 제외하기 위해 VSN 변환을 하여 분산을 안정화 시키고, quantile normalization을 수행하였다. 정규화된 유전자를 이용하여 각 처치 군에 대해 two-way ANOVA (analysis of variation)을 실시하고, 유전자간에 변화가 의의 있는 유전자 군을 선별(p -value <0.05)하였다. 각 그룹에 대해서 발현 형태가 비슷한 유전자들을 묶는 self-organizing map(SOM)을 이용하여 각 그룹의 특이한 유전자 발현의 변동을 관찰하고 gene ontology 분석을 수행하였다.

결과 및 고찰

Phenylbutazone에 의한 간 독성의 혈청학적/조직학적 분석

혈청 분석 시험을 이용하여 간세포 괴사에 의한 ALT와 AST의 변화된 정도를 생화학적으로 관찰 할 수 있다. 그러나, 급성 바이러스 감염에 의한 간 손상에서처럼 phenylbutazone의 급성 간 손상의 경우도 농도 비의존적으로 나타나므로(James *et al.*, 1994), 혈청의 생화학적인 분석에서 유의미한 변화를 관찰 할 수 없었다(자료 미공개). 고농도 처리한 쥐 간의 조직학적 검사에서, 6시간째 희생한 실험 군은 임파구와 호중성 백혈구의 침윤으로 나타나는 간세포의 괴사로 인하여 소엽의 구조를 흐트러트려졌으며, 낮은 농도를 처리한 군의 간 조직에서는 높은

농도에서 관찰되는 것보다 병변이 적게 보였다. 간세포의 팽창은 24시간째에 간 조직 또한 6시간째 것과 비슷한 소견이었다. 그러나, 72시간째 간 조직에서는 24시간째 관찰한 간세포의 팽창이 없어졌다. 따라서, 간 조직의 조직학적 검사에서는 용량과 시간에 의존적으로 간 조직의 병변이 뚜렷이 나타나며, 72시간째에는 이런 현상이 호전되는 것으로 여겨진다(Fig. 2).

Phenylbutazone에 의한 유전자 발현 변화

Microarray 실험의 특성상 실험의 재현성을 확인하고, 비생물학적 변동을 최소화하기 위하여 3회 반복하여 수행하였다. 최소한 한가지 시간 대에서 p -value <0.05 이고, 1.5배 이상의 값을 나타내는 4305개의 유의미한 유전자 군들을 선별하고 SOM clustering을 통해, vehicle에서 유전자 발현 값이 무의미하게 변하거나, 시간과 농도에 상관없이 움직이는 유전자들은 제외하였다. 선별된 유전자들은 Gene ontology(GO)를 이용하여 간 독성 물질에 급성으로 노출 되었을 때 주로 나타나는 것으로 알려진 지방간(Farrell, 1994) 및 독소에 의한 간세포의 손상 메커니즘과 관련된 계열들, 즉 지방산과 지질 메커니즘, 산화성 스트레스 반응 등에 대해 변화가 관찰되는 유전자군들 분류하여 Table 1과 2에 나열하였다. 매우 낮은 농도로 처리하였기 때문에 두 농도 사이에 유전자 발현 변화는 적었으나, 시간 의존적인 방법으로 6시간과 24, 72시간의

Table 1. Gene expression changes after phenylbutazone dosage: Fatty acid and lipid metabolism

Function	Gene	Gene symbol	L_6	L_24	L_72	H_6	H_24	H_72
Fatty acid and lipid metabolism								
	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1	Acaa1	2.81	2.60	2.86	2.88	2.75	2.72
	acetyl-Coenzyme A dehydrogenase, long-chain	Acadl	2.93	2.79	2.59	2.94	2.93	2.71
	acyl-CoA synthetase long-chain family member 4	Acs14	2.29	3.04	2.54	1.85	2.92	1.95
	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain	Acad5b	2.42	2.86	2.82	1.79	2.39	2.26
	acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	Acox1	2.13	2.30	2.45	0.91	2.40	2.75
	aldehyde dehydrogenase 8 family, member A1	Aldh8a1	2.24	2.73	2.58	1.56	2.45	2.57
	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A3	Aldh1a3	3.07	2.54	2.14	0.58	8.79	1.05
	bile acid-Coenzyme A: amino acid N-acyltransferase	Baat	2.61	2.76	2.74	2.38	2.52	2.58
	butyryl Coenzyme A synthetase 1	Bucs1	2.39	2.75	2.79	1.98	2.63	2.70
	cytochrome P450, 51	Cyp51	1.77	2.98	3.01	1.73	2.63	2.59
	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 7	Hsd3b7	2.16	2.85	2.80	2.10	2.65	2.61
	hydroxysteroid dehydrogenase-1, delta<5>-3-beta	Hsd3b1	2.39	21.5	3.88	3.00	116.7	41.8
	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like	Nsdhl	1.60	2.88	2.48	1.35	2.80	2.75
	peroxiredoxin 6	Prdx6	2.25	2.79	2.73	1.95	2.64	2.67
	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 4	Slc27a4	1.88	2.95	2.16	0.86	3.58	3.43
	STAR-related lipid transfer (START) domain containing 4	Stard4	1.63	3.08	2.32	1.50	2.49	2.72
	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	Scd1	1.86	2.82	2.43	1.28	2.87	2.68
	sterol carrier protein 2, liver	Scp2	2.32	2.74	2.78	1.55	2.50	2.58

* fold change: ¹ L_6 : low dose 6 hr/vehicle 6 hr, L_24 : low dose 24 hr/vehicle 24 hr, L_72 : low dose 72 hr/vehicle 72 hr, H_6 : High dose 6 hr/vehicle 6 hr, H_24 : High dose 24 hr/vehicle 24 hr, H_72 : High dose 72 hr/vehicle 72 hr, List of genes showing at least a 1.5 fold difference with $p<0.05$.

Table 2. Gene expression changes after phenylbutazone dosage: Oxidoreductase/oxidative response

Function	Gene	Gene symbol	L_6	L_24	L_72	H_6	H_24	H_72
Oxidoreductase/oxidative response								
	aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1	Aldh1b1	2.37	2.74	2.90	1.91	2.78	2.90
	aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial	Aldh2	2.58	2.70	2.69	2.03	2.70	2.68
	aldehyde dehydrogenase 8 family, member A1	Aldh8a1	2.24	2.73	2.58	1.56	2.45	2.57
	aldehyde dehydrogenase family 7, member A1	Aldh7a1	2.51	2.54	2.78	1.49	2.45	2.57
	aldo-keto reductase family 1, member D1	Akr1d1	2.13	2.78	2.82	1.01	2.49	2.55
	catalase	Cat	2.31	2.71	2.74	1.37	2.60	2.49
	cysteine dioxygenase 1, cytosolic	Cdo1	2.63	2.71	2.72	2.01	2.52	2.61
	cytochrome c oxidase subunit VIIIb	Cox7b	2.97	2.76	2.67	2.70	2.83	2.73
	cytochrome c oxidase, subunit Vb	Cox5b	1.19	1.86	8.07	0.80	2.04	6.69
	cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 22	Cyp2d22	2.55	2.66	2.77	1.73	2.62	3.06
	cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 26	Cyp2d26	2.57	2.60	2.70	2.18	2.51	2.63
	cytochrome P450, family 2, subfamily j, polypeptide 5	Cyp2j5	2.36	2.81	2.59	1.95	2.54	2.64
	cytochrome P450, family 2, subfamily j, polypeptide 9	Cyp2j9	3.65	3.74	2.65	4.61	3.78	2.61
	cytochrome P450, family 26, subfamily a, polypeptide 1	Cyp26a1	2.51	2.62	2.42	2.48	2.33	2.77
	cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 13	Cyp3a13	3.50	2.07	3.66	4.30	1.98	2.88
	flavin containing monooxygenase 5	Fmo5	2.86	2.83	2.70	2.96	2.81	2.63
	glutathione peroxidase 1	Gpx1	2.52	2.72	2.67	2.54	2.60	2.64
	glutathione reductase 1	Gsr	2.20	2.89	2.61	1.65	2.74	2.43
	hydroxyacid oxidase 1, liver	Hao1	2.56	2.73	2.94	2.54	2.62	2.92
	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4	Hsd17b4	2.35	2.66	2.92	1.35	2.49	2.50
	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble	Idh1	2.15	2.61	2.59	0.96	2.38	2.52
	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 7	Ndubf7	2.75	2.66	2.65	2.93	2.83	2.65
	NADPH cytochrome B5 oxidoreductase	Ncb5or	2.76	2.52	3.90	2.97	1.96	2.97
	phosphogluconate dehydrogenase	Pgd	1.91	2.84	2.25	1.73	3.00	2.74
	retinol dehydrogenase 11	Rdh11	1.85	2.60	2.30	2.00	2.67	2.60
	retinol dehydrogenase 7	Rdh7	2.45	2.81	2.66	2.28	2.65	2.70

* fold change: ¹ L_6 : low dose 6 hr/vehicle 6 hr, L_24 : low dose 24 hr/vehicle 24 hr, L_72 : low dose 72 hr/vehicle 72 hr, H_6 : High dose 6 hr/vehicle 6 hr, H_24 : High dose 24 hr/vehicle 24 hr, H_72 : High dose 72 hr/vehicle 72 hr, List of genes showing at least a 1.5 fold difference with $p < 0.05$.

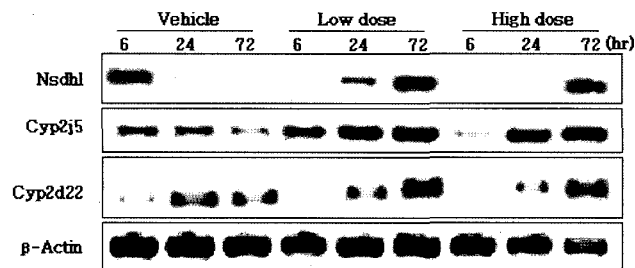


Fig. 3. Semi-quantitative RT-PCR analysis of genes differentially expressed after phenylbutazone-administered. The relative expression level of each gene was normalized by that of β -actin. From the list in Tables 1 and 2, three of the genes involved in hepatotoxicity were selected for semi-quantitative RT-PCR. The primer sets used for RT-PCR are shown in Table 3. The RNA samples used for semi-quantitative RT-PCR were identical to those used for the microarray analysis.

비교에서는 증가됨을 확인할 수 있었다.

이러한 고밀도 유전자 칩 결과의 정확성을 높이기 위해 유의미한 유전자군들 중 여러 개의 유전자들을 선별하여

RT-PCR을 수행하였다(Fig. 3).

지방산과 지질 메커니즘에 관여하는 유전자 군(Table 1). 지방간의 발생원인으로는 유리 지방산의 과다 공급과 지방산의 합성 또는 에스터화 반응, 지방산 산화 감소, 스테로이드 호르몬의 과다 분비 등이 알려져 있다. 우리의 유전자 발현 형태를 보면, 긴사슬 지방산을 fatty acyl CoA esters로 변환할 수 있는 acyl-CoA synthetase long-chain family member 4(Acsl4) 유전자와 trans-2-enoyl-CoA와 peroxide로 fatty acyl CoA의 산화를 촉진하는 acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl(Acox1) 유전자는 저농도와 고농도 노출 후 24시간째에서 높게 발현되었다. 콜레스테롤은 스테로이드 호르몬과 담즙산 합성에 기질로서 작용하게 되는데, NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like(Nsdhl) 유전자는 콜레스테롤 생합성에 관여하는 효소들인 sterol dehydrogenase 또는 decarboxylase 등을 코딩하는 것으로 알려져 있다(Hugo & Gail, 2003; Murphy and Vance, 1999). 또한 잘 발달된 lipid droplet에 위치해 있는 Nsdhl이 증가되면 전구체 sterol(C-30, 29, 28)의 C-27 sterols로의 전환이 감소되

Table 3. Primer sequences for the genes with representative expression patterns that were used to validate the microarray analysis by semi-quantitative RT-PCR

Gene	Genbank Acc. No.	Primer sequence
Nsdhl	AK088026	F: CCAGCTGATCATGGTGAATC R: TGGCACTGCTGGTTAAAATGAGTTT
Cyp2j5	NM_010007	F: ATGGCACTGAGGAACCTTTGG R: CTCTTGGCTCATCTGGGTTTC
Cyp2d22	NM_019823	F: GGCGCTTCTCTGTGTCTACC R: GTCCAGGTCGTCTTGTGTT

어 나타난다. 따라서, lipid droplet에 위치한 Nsdhl은 콜레스테롤 생합성 조절에 중요한 기능을 한다(Masato *et al.*, 2003). 우리의 결과에서도 Nsdhl 유전자의 발현이 저농도와 고농도에서 시간에 따라 증가하는데(Fig. 3), 이는 phenylbutazone에 의해 생성된 많은 지방산들을 이용하여 콜레스테롤 생합성에 관여하는 것으로 생각된다. 이런 결과들은 지방간 유도에 영향을 줄 것으로 예상되는 반면, 지방산 straight-chain의 미토콘드리아 베타-산화 초기 과정을 촉진하는 4개의 효소 중 하나인 acetyl-Coenzyme A dehydrogenase, long-chain(Acadl) 유전자가 모든 시간대에서 2배 이상 증가하는 것으로 보아 지방간의 유발을 억제하려는 작용도 같이 나타남을 알 수 있었다(Table 1). 일반적으로 간 손상을 유발할 수 있는 농도보다 낮은 농도를 처리하였으나 지방간의 초기 발생에 관여하는 유전자가 활성화됨을 알 수 있었다. 그러나, 이렇게 발현이 증가된 유전자들에 의한 지방간이 발생되지 않는 것은 지방간 초기 발생에 관여하는 유전자가 활성화됨과 동시에 지방간의 억제에 작용하는 유전자들 발현되어 상호작용이 이루어진 것으로 보인다.

산화 환원 효소 및 산화성 스트레스 반응에 관여하는 유전자군. 알콜 대사에서 중요한 산화적 경로(Lieber, 1997)에서 두 번째 효소인 aldehyde dehydrogenase 1, 2, 8, 7(Aldh1b1, 2, 8a1, 7a1) 등의 유전자들이 높은 수준으로 발현이 되었으며, 지질 과산화작용 생성물의 해독에 관여하는 aldo-keto reductase family 1, member B7(Akr1b7)은 24시간째 급격히 증가하다가 72시간째에 급격히 감소하는 형태를 나타내었다. cytochrome c oxidase subunit VIIIb(Cox7b) 유전자는 전반적으로 대조군에 비해 높은 수준으로 나타났고, cytochrome c oxidase, subunit Vb(Cox5b)는 약물 노출 후 72시간째에 발현이 증가함을 관찰 할 수 있었다. 간독성의 메커니즘에서 cytochrome P450 에 의한 생물활성을 빼놓을 수 없는데(Albano *et al.*, 1996) 이 약물에 의해서도 여러 cytochrome P450 family들의 발현 변화가 관찰 되었다. steroid를 유도할 수 있는 cytochrome P450, family3,

subfamily a, polypeptide 1(Cyp3a13) 유전자는 6시간째 가장 높게 발현 되었다. 간과 신장에서 발현되고 아라키돈산 대사과정에서 활성화(Ma *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1996, 1997; Zeldin *et al.*, 1996; Ou *et al.*, 2001) 되는 cytochrome P450, family2, subfamily j, polypeptide 5(Cyp2j5), cytochrome P450, family2, subfamily j, polypeptide 9(Cyp2j9)는 약물 처치 후 모든 시간에서 2 배 이상 발현 되어 나타났다. RT-PCR 결과에서도 Cyp2j5 유전자는 대조군에 비해 발현이 많이 증가하였으며(Fig. 3), Cyp2j9 유전자의 경우도 저농도 투여 군에서 증가하는 것을 확인하였다(자료 미개제). 이 결과는 phenylbutazone 이 대사과정 중 아라키돈산의 주요 대사 경로 중 하나인 cyclooxygenase에 의한 PGH synthase와 prostacyclin synthase 수준을 억제시키므로, 간과 신장에서 아라키돈산 대사과정의 대체 경로로 알려져 있는 CYP(Morrison and Pascoe, 1981; Oliw *et al.*, 1981; Capdevila *et al.*, 1981)를 이용하여 대사과정을 진행하는 것으로 추측 된다. 그 외에도 약물 대사과정에서 중요한 4가지 효소 중 하나인 Cyp2d6와 유사성이 높은 Cyp2d22 또한 대조군에 비해 발현이 증가하는 것으로 보아(Fig. 3), phenylbutazone 대사에 관여할 것으로 예상된다.

지금까지 phenylbutazone을 급성으로 처치하였을 때 간의 혈청학적, 조직학적 변화와 고밀도 유전자 칩을 이용한 유전자 변화를 보고하였다. 낮은 수준의 phenylbutazone에 노출 되어도 지방산 및 지질 대사관련 유전자, 산화성 스트레스관련 유전자, 세포사멸관련 유전자들의 발현 형태가 변화함을 관찰 할 수 있었다. 약물대사에서 산화환원 효소의 발현 및 지방산 대사조절 유전자들의 증가나 감소는 약물 처리 후 초기 단계(Wang *et al.*, 1995)에 많이 나타나게 되므로, 앞으로 검증의 단계를 거쳐 확인된 유전자들은 이러한 약물을 노출되었을 때 독성의 지표로 사용 할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 연구는 2005년도 식품의약품안전청(KFDA) 연구비 지원에 의한 연구임(KFDA-05122-TGP-584).

참고문헌

- Albano, E., Clot, P., Morimoto, M., Tomasi, A., Ingelman-Sundberg, M. and French, S.W. (1996): Role of cytochrome P4502E1-dependent formation of hydroxylethyl free radical in the development of liver damage in rats intragastrically fed with ethanol. *Hepatology*, **23**, 155-163.
- Arai, I., Hirose, H., Muramatsu, M., Okuyama, S. and Aihara,

- H. (1985): Possible involvement of non-steroidal anti-inflammatory drugs in vagal-mediated gastric acid secretion in rats. *Jpn. J. Pharmacol.*, **37**, 91-99.
- Capdevila, J., Chocos, N., Werringloer, J., Prough, R.A. and Estabrook, R.W. (1981): Liver microsomal cytochrome P-450 and the oxidative metabolism of arachidonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 5362-5366.
- Cutis, D. Klassen (2001): Casarett and Doull's Toxicology: The Basic science of poisons (6th edition), The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Faigle and Dieterle (1977): The biotransformation of phenylbutazone (Butazolidin). *J. Int. Med. Res.* 5 Suppl **2**, 2-14.
- Farrell, G.C. (1994): Drug-Induced Liver Diseases. Edinburgh: Churchill Living-stone.
- Fowler, P. (1967): Marrow toxicity of the pyrazoles. *Ann. Rheum. Dis.*, **26**, 344-345.
- Gilman, A.G., Goodman, L., Rall, T.W., Murad, F., Eds. (1985): Goodman and Gilman's: The pharmacologic Basis of Therapeutics (7th edition). New York, Macmillan Publishing Co., Inc.
- Hugo Caldas and Gail E. (2003): Herman NSDHL, an enzyme involved in cholesterol biosynthesis, traffics through the Golgi and accumulates on ER membranes and on the surface of lipid droplets. *Hum. Mol. Genet.*, **12**, 2981-2991.
- James W. Long and James J. Rybacki (1994): The Essential Guide to Prescription Drugs.
- Kaplowitz, N., Aw, T.Y., Simon, F.R. and Stolz, A. (1986): Drug-induced hepatotoxicity. *Ann. Intern. Med.*, **104**, 826-839.
- Lieber, C.S. (1997): Cytochrome P-450E1: its physiological and pathological role. *Physiol. Rev.*, **77**, 517-544.
- Lees, P. and Higgins, A.J. (1987): Physiological, biochemical and haematological effects on horses of a phenylbutazone paste. *Vet. Rec.*, **121**, 56-60.
- Ma, J., Qu, W., Scarborough, P.E., Tomer, K.B., Moomaw, C.R., Maronpot, R., Davis, L.S., Breyer, M.D. and Zeldin, D.C. (1999) : Molecular cloning, enzymatic characterization, developmental expression, and cellular localization of a mouse cytochrome P450 highly expressed in kidney. *J. Biol. Chem.*, **274**, 17777-17788.
- MacAllister, C.G., Morgan, S.J., Borne, A.T. and Pollet, R.A. (1993): Comparison of adverse effects of phenylbutazone, flunixin meglumine, and ketoprofen in horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **202**, 71-77.
- Masato, O., Noboru, M., Yukiko, K. and Tamotsu, Y. (2003): Localization of mammalian NAD(P)H Steroid Dehydrogenase-like protein on lipid droplets. *J. Biol. Chem.*, **278**, 36819-36829.
- Morrison, A.R. and Pascoe, N. (1981): Metabolism of arachidonate through NADPH-dependent oxygenase of renal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*, **78**, 7375-7378.
- Murphy, D.J. and Vance, J. (1999): Mechanisms of lipid-body formation. *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 109-115.
- Oliw, E.H., Lawson, J.A., Brash, A.R. and Oates, J.A. (1981): Arachidonic acid metabolism in rabbit renal cortex. Formation of two novel dihydroxyeicosatrienoic acids. *J. Biol. Chem.*, **256**, 9924-9931.
- Qu, W., Bradbury, J.A., Tsao, C.C., Maronpot, R., Harry, G.J., Parker, C.E., Davis, L.S., Breyer, M.D., Waalkes, M.P., Falck, J.R., Chen, J., Rosenberg, R.L. and Zeldin, D.C. (2001): Cytochrome P-450 CYP2J9, a new mouse omega-1 hydroxylase predominately expressed in brain. *J. Biol. Chem.*, **27**, 25467-25479.
- Reed, G.A., Griffin, L.O. and Eling, T.E. (1985): Inactivation of prostaglandin H synthase and prostacyclin synthase by phenylbutazone. *Mol. Pharmacol.*, **27**, 109-114.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. and Brown, P.O. (1995): Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, **270**, 467-470.
- Wang, X., Wang, W., Bengmark, S. and Andersson, R. (1995): Alterations of lipid contents in blood, hepatocytes, and enterocytes in the early stage of acute liver failure induced by 90% hepatectomy in the rat. *J. Surg. Res.*, **59**, 326-336.
- Wu, S., Chen, W., Murphy, E., Gabel, S., Tomer, K.B., Foley, J., Steenbergen, C., Falck, J.R., Moomaw, C.R. and Zeldin, D.C. (1997): Molecular cloning, expression, and functional significance of a cytochrome P450 highly expressed in rat heart myocytes. *J. Biol. Chem.*, **272**, 12551-12559.
- Wu, S., Moomaw, C.R., Tomer, K.B., Falck, J.R. and Zeldin, D.C. (1996): Molecular cloning and expression of CYP2J2, a human cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase highly expressed in heart. *J. Bio. Chem.*, **271**, 3460-3468.
- Zimmerman, H.J. (1978) : Hepatotoxicity. The Adverse Effects of Drugs and Other Chemicals in the liver, Lippincott Williams & Wilkins, New York.
- Zeldin, D.C., Moomaw, C.R., Jesse, N., Tomer, K.B., Beetham, J., Hammock, B.D. and Wu, S. (1996): Biochemical characterization of the human liver cytochrome P-450 arachidonic acid epoxygenase pathway. *Arch Biochem Biophys*, **330**, 87-96.