

바이오 디지털 콘텐츠를 이용한 독성의 분석

강진석*

요약

화학물질은 생체에 들어오면 여러 가지 독성반응을 나타내는데, 독성반응에 따른 유전자 발현을 분석하기 위해 바이오 칩 등을 이용한 신기술이 확산되면서 바이오 디지털 콘텐츠가 다량으로 생성되고 있다. 이 콘텐츠는 그 자체로는 의미가 적고 컴퓨터를 이용한 분석과 보정과정을 거쳐 생물학적으로 의미 있는 값들을 선별하여야 한다. 이런 콘텐츠에는 유전자들의 발현 양상 측정용 목적으로 하는 유전체학(genomics), 유전자의 발현 양상을 측정하는 전사체학(transcriptomics), 단백질의 발현을 측정하는 단백체학(proteomics), 대사체의 발현을 측정하는 대사체학(metabolomics) 등이 있으며, 이를 통칭하여 오믹스(omics)라고 부른다. 오믹스 기술을 독성을 연구하는 분야에 접목한 것이 독성유전체학(toxicogenomics)이며, 이에 대한 콘텐츠를 분석함으로써 독성을 예측하고 독성기전을 규명할 수 있다. 독성분석에 있어서 초기 단계의 분석은 향후 만성독성의 예측에 있어서 중요한 부분을 차지하고 있다. 바이오 디지털 콘텐츠를 이용하여 독성을 예측함에 있어 기존의 방법보다 더 빠르고 정확하게 예측하기 위해서는 많은 정보에 대한 분석기술의 진보가 필요하다. 또, 바이오 디지털 콘텐츠를 이용한 독성예측에 있어서 전체세포보다는 생물학적 현상을 일으키는 특이세포에서 이런 정보를 얻는 것이 중요하다고 생각된다. 또, 향후 바이오 디지털 콘텐츠 분석은 전략적 실험설계에 의한 데이터가 분석되고 축적되어야 하고, 분석알고리즘을 통한 네트워크 분석이 이루어져야 하며, 통합적 데이터 구축을 통해 이루어져야 할 것으로 생각된다.

Analysis of toxicity using bio-digital contents

Jin Seok Kang*

Abstract

Numerous bio-digital contents have been produced by new technology using biochip and others for analyzing early chemical-induced genes. These contents have little meaning by themselves, and so they should be modified and extracted after consideration of biological meaning. These include genomics, transcriptomics, proteomics, metabolomics, which combined into omics. Omics tools could be applied into toxicology, forming a new field of toxicogenomics. It is possible that approach of toxicogenomics can estimate toxicity more quickly and accurately by analyzing gene/protein/metabolite profiles. These approaches should help not only to discover highly sensitive and predictive biomarkers but also to understand molecular mechanism(s) of toxicity, based on the development of analysing technology. Furthermore, it is important that bio-digital contents should be obtained from specific cells having biological events more than from whole cells. Taken together, many bio-digital contents should be analyzed by careful calculating algorithm under well-designed experimental protocols, network analysis using computational algorithm and related profound databases.

Keywords : bio-digital contents, toxicogenomics, microarray, toxicity

1. 서론

※ 제일저자(First Author) : 강진석
접수일:2009년 11월 23일, 완료일:2010년 03월 31일
* 남서울대학교 임상병리학과
kang@nsu.ac.kr
■ 이 논문은 2008학년도 남서울대학교 학술연구비 지원에 의해 연구되었습니다.

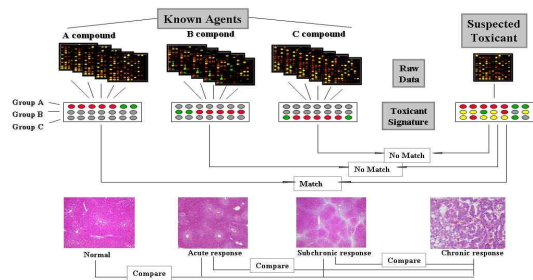
바이오 칩 등을 이용한 신기술이 확산되면서 바이오 디지털 콘텐츠가 다량으로 발생하고 있다. 보통 oligonucleotide, cDNA, RNA, 단백질 등의 생체분자를 작은 조직 위에 점을 찍거나 도장을 찍어 바이오 칩이 만들어지는데, 이러한

칩은 마이크로어레이(microarray: 실리콘, 플라스틱, 유리 등의 표면 위에 접근이 가능한 이차원적 구조의 배열을 하는 것을 말하며, 컴퓨터 칩을 제조하는 것과 유사한 방법으로 제작함) 기술이 현실화됨으로 인해 급속도로 사용되었다.

각 배열에 있는 분자와 시료가 반응하여 신호를 나타내는데 이 신호가 바이오 디지털 콘텐츠가 된다. 이 콘텐츠는 그 자체로는 의미가 적고 분석과 보정과정을 거쳐 생물학적으로 의미 있는 값들을 선별하여야 하며, 선별된 값들이 컴퓨터를 이용하여 생물학적 의미와 연결시키고 신속하고 정확하게 분석하여야 한다.

2. 바이오 디지털 콘텐츠의 특징

바이오 디지털 콘텐츠에는 유전자들의 발현 양상 측정을 목적으로 하는 유전체학(genomics), 유전자의 발현 양상을 측정하는 전사체학(transcriptomics), 단백질의 발현을 측정하는 단백체학(proteomics), 대사체의 발현을 측정하는 대사체학(metabolomics) 등이 있으며, 이를 통칭하여 오믹스(omics)라고 부르며, 오믹스 기술을 독성을 연구하는 분야에 접목한 것이 독성유전체학(toxicogenomics)이다. 독성유전체 기술을 이용하여 물질에 대한 독성에 의해 변화되는 다양한 콘텐츠를 얻을 수 있으며 이 유전자/단백질/대사물질 발현프로파일에 대한 콘텐츠를 분석함으로써 독성을 예측하고 독성기전을 규명할 수 있다(그림 1).



(그림 1) Diagram for toxicogenomics

최근 이 연구동향은 장기적인 시험을 대체할 수 있는 방법으로 이런 독성분석에 이용하고 있으며, 특히 독성 초기 단계의 유전자 발현을 분석하여 장기적인 시험의 결과를 예측하고자 하

는 방법으로 주목받고 있다.

3. 독성유전체학의 기술발달 상황

독성유전체기술은 2000년 11월 미국 국립보건원(NIH) 산하 국립환경보건과학연구소(NIEHS) 내에 국가독성유전체기술센터(NCT)가 설립되면서 시작되었으며, 일본은 미국보다 조금 늦게 시작하였지만 후생노동성 산하 국립의약품식품위생연구소(NIHS) 주도로 2002년 3월에 독성유전체기술 연구 프로젝트를 본격적으로 개시하였다. EU는 실험동물의 사용 감소를 위한 대체시험법 개발의 일환으로 독성유전체 기술에 집중적인 투자를 하고 있으며, 각 나라 별로 독성유전체센터가 운영 중이다. 국제적으로는 ILSI-HESI 협력프로그램을 통해 여러 나라의 정부기구와 기업 및 학계를 포함한 참여로 필요한 관련 협력 사업을 다양하게 발굴 및 추진되고 있다[1].

우리나라에서는 2002년 11월 국가기술지도 보고서에 독성유전체기술을 포함시켜 향후 국가핵심전략기술의 하나로 평가하였고 국내 여러 기관에서 독성유전체 기술을 사용한 연구가 진행되고 있으며, 인체유해물질의 안전성관리 기법과 환경유해물질 중심의 연구가 중점적으로 진행되고 있다..

4. 독성연구에 독성유전체 기술 도입

보통 미지의 물질이 개발되어 사람에게 적용되려면 일반독성시험(general toxicological test)을 행하여 사람에게 미치는 영향을 미리 예측하게 된다. 이 일반독성시험에는 한 번에 약 20-100 마리의 시험동물을 이용하여 독성이 나타나지 않는 값인 NOAEL(No Observed Adverse Effect Level)을 찾는 것으로 진행되고 있다. 일반적으로 물질에 대한 독성의 판정은 생체내 화학물질에 노출되었을 때의 형태학적 변화(체중, 임상검사, 장기기능, 조직병리학적 변화 등)를 측정함으로써 실시하여 왔는데 전통적인 독성연구방식에서는 일반적으로 고농도의 물질처치가 필요하며, 종말점을 확인하기까지 긴 시간이 요구된다. 이런 전통적인 독성연구방식은 현저한 독성변화가 있는 경우에는 매우 효과적으로 검출할 수 있지

만, 미세한 독성변화의 관측이나 예측에는 판정이 효과적이지 못하다는 단점이 있다.

또, 사회적으로 독성을 검사해야 할 물질의 수가 증가하고 있으며, 평가방법도 강화시킬 것을 요구하고 있다. 최근 새로운 식품 및 의약품, 화학물질 등이 국내외에서 다수 개발되고 있고, REACH(Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) 정책의 시행에 따라 화학물질의 위해도 평가가 강화되고 있으며, 이에 따라 여러 물질에 대한 독성을 신속하고 정확하게 파악해야 하는데 기존의 방법으로는 이러한 사회적 요구를 따라가는데 한계가 있다.

또한, 전 세계적으로 동물시험을 대체할 수 있는 시험법을 요구하고 있다. 실험동물의 복지가 사회적 이슈로 등장하고 있으며 동물시험의 감소요구가 나타나고 있어서 동물시험을 대체할 수 있는 시험법 개발이 필요한 시점이다.

독성유전체 기술은 위와 같은 기존의 독성시험법의 단점을 보완하고, 많은 바이오 디지털 콘텐츠를 한 번에 얻을 수 있어서 화학물질의 작용에 대한 고속대량검색과 다수의 종말점을 동시에 분석할 수 있다는 장점을 갖는다.

5. 바이오 디지털 콘텐츠 분석요건

바이오 디지털 콘텐츠 분석을 위해서는 다음과 같은 사항이 필요하다.

첫째, 바이오 디지털 콘텐츠를 처리하기 위해서는 먼저 발현분석 프로그램의 개발이 필요하다. 초기의 기능 예측이 주로 유사성 분석 알고리즘의 개발과 유사성 평가를 위한 과정개발에 중점을 두었지만, 최근에는 많은 오믹스 데이터를 통합하고 이를 생체내 네트워크와 연결하여 분석하고 이를 바탕으로 생체 시스템을 모델링하려는 연구가 진행되고 있다. 보통 생물정보 콘텐츠를 분석함에 있어서 전처리(pre-processing)를 통해 나온 데이터 마이닝이 중요하게 생각되고 있는데, 이러한 데이터 마이닝에는 클러스터링(clustering)을 통해 군간의 상관성 분석을 시도하는 것과 정보간의 상호 연관을 알아보기 위한 네트워크(genetic network)의 분석 등이 있으며, 이를 군간의 유전자 발현변화를 분석하기 위해서는 k-mean, SOM (self-organizing maps),

k-NN (k-nearest neighbor), SMA (significance of analysis of microarray) 등의 방법이 필요하다[2].

또, 둘째, 여러 기관에서 생산된 정보 데이터를 표준화하여야 한다. 마이크로어레이 표준화를 위해 MIAME(Minimum Information for a Microarray Experiment)라는 규정이 제시되었으며, 이를 바탕으로 독성유전체학을 위한 표준양식인 MIAME-Tox가 발표되었다. 또, 2005년부터 MAQC(Microarray Quality Control) 프로젝트를 등을 수행하여 마이크로어레이 플랫폼들을 비교 분석하여 플랫폼간의 재현성을 보고하였다[3-6]. 제안된 독성 관련 발현 유전체의 가이드라인은 ArrayExpress(유럽), GEO(미국), CIBEX(일본) 과 같은 공개된 발현 유전체데이터베이스의 정보들을 수집, 분석 할 수 있는 방법까지 제안되어 있다.

셋째, 통합적 데이터베이스를 구축하여야 한다. 통합 데이터베이스의 구축은 데이터 마이닝을 위한 메타데이터의 구축과 대량 데이터의 가시화 부분을 주축으로 발전하고 있다. 현재 독성 유전체 데이터의 통합 부분에서 가장 문제가 되는 점은 실험 디자인과 측정하는 장비의 특성에 따라 실험 결과들이 편차를 나타나고 있다는 것이다. 따라서 단순한 데이터의 통합을 통해서는 새로운 지식의 창출이 힘들며 지식 기반의 데이터 통합이 필수적으로 인식되고 있는 추세이다.

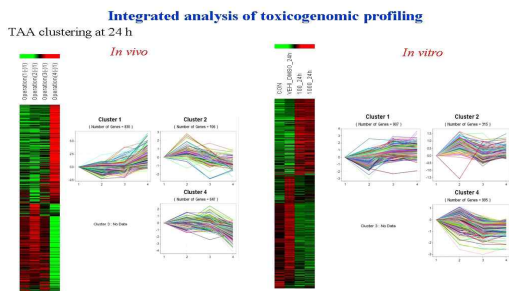
6. 바이오 디지털 콘텐츠를 이용한 독성분석 사례

바이오 디지털 콘텐츠는 독성판정에 이용할 수 있다. 간독성을 예를 들면 간독성은 병리학적으로 세포괴사형(necrosis), 지방간(fatty change), 간염(hepatitis), 담즙정체(cholestasis), 간경화(cirrhosis), 섬유증(fibrosis), 간암(hepatic cancer)등으로 구별할 수 있는데 간독성 유형별로 독성반응과 유전자발현변화에 대한 바이오 디지털 콘텐츠를 이용하여 독성을 판정할 수 있다.

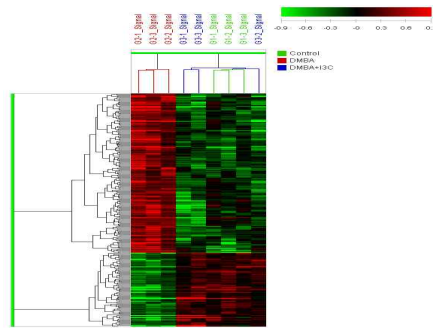
또, 생체내와 시험관내의 발현프로파일을 얻어 이를 상호 비교하는 연구를 통해 두 시험계간의 가교를 마련할 수 있다. 연구접근방향에 따라 생체 내에서 여러 간독성 물질[7-10] 혹은 발암성 물질[11]에 의해 변화되는 유전자를 분석하

거나, 시험관 내에서 변화되는 유전자를 분석할 수도 있다[12]. 또한 마이크로레이법을 이용하여 독성을 일으키는 물질을 생체내와 시험관내에 적용하여 각 시스템의 유전자 발현양상을 hierarchical clustering, k-means clustering, SOM clustering 등으로 분석할 수 있다[13, 14]. 이에 대한 분석사례를 (그림 2)에 나타내었다. 또한 유전자의 발현프로파일을 그룹별로 혹은 유전자별로 클러스터링하여 특정 유전자 그룹의 바이오 디지털 콘텐츠 양상을 확인할 수 있다. 이에 대한 분석사례를 (그림 3)에 나타내었다. 또한, 간독성에 관련된 바이오 디지털 콘텐츠를 분석하여 간독성에 관련된 유전자를 선별한 후 이들 유전자에 대한 siRNA를 이용하여 독성의 변화가 나타나는 것을 확인할 수 있다[15].

또, 바이오 디지털 콘텐츠는 여러 독성기전연구에 사용할 수 있다. 예를 들면, 발암성평가에 있어서 시험동물에 시험물질을 보통 2년간 적용하여 암의 생성을 종말점으로 보고 평가하게 되는데 이를 수행하기 위해서는 많은 수의 동물과 장기간의 시간이 소요된다. 이 콘텐츠를 분석하여 발암성 평가를 하게 되면 시험 기간 단축, 동물 수의 감소 등을 할 수 있을 것으로 예상되고 있다. 발암화 과정에 따라 초기병변과 종양단계의 병변을 비교할 수 있으며[16-21], 발암물질에 따른 종양형태를 비교 분석하여 발암물질에 따른 발생기전을 분석하거나[22-24], 특수 이상조직만을 분리하여 이를 전체조직과 병변조직을 비교분석할 수 있다[20, 25-27]. 향후 암발생에서 중심적인 역할을 하는 암줄기세포를 표적으로 하여 바이오 디지털 콘텐츠를 분석하는 연구방법도 암발생기전을 규명하기 위한 유용한 접근방법으로 생각된다.



(그림 2) Gene expression profile by treatment of thioacetamide (TAA), one of hepatotoxicants



(그림 3) Gene expression profile by treatment of dimethylbenz[a]anthracene (DMBA), one of mammary carcinogens

7. 결론

바이오 디지털 콘텐츠 분석을 효과적으로 수행하기 위해서는 전략적 실험설계에 의한 데이터가 축적되어야 하고, 이를 면밀히 분석할 수 있는 알고리즘을 개발하여야 하며, 나아가 혈액학 및 조직병리학적 자료 등의 전통적인 독성학적 연구 자료와 연계하여 총체적인 작업을 진행하여야 한다. 또한, 생물학적 접근 방식에 있어서 전체 세포에 대한 접근보다는 독성발현에 중요한 역할을 하는 세포에 대한 특이적인 발현분석을 통해 접근하는 것이 중요하다고 생각된다. 더 나아가 이런 바이오 디지털 콘텐츠를 종합적으로 관리할 수 있는 데이터베이스를 구축을 통해 분석 알고리즘을 보다 적극적으로 확대 적용해 보아야 할 것으로 판단된다. 또한, 바이오 디지털 콘텐츠를 분석에 있어서 독성의 초기단계에서의 발현이 중요한데, 세포 전체에 대한 콘텐츠 분석보다는 특이적인 세포에서 나타나는 콘텐츠를 분석하는 것이 독성예측에 중요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- [1] Pennie W, Pettit SD, Lord PG. Toxicogenomics in risk assessment: an overview of an HESI collaborative research program. Environ Health Perspect 2004; 112:417-9.
- [2] Clarke PA, te Poele R, Workman P. Gene expression microarray technologies in the development of new

- therapeutic agents. *Eur J Cancer* 2004;40:2560-91.
- [3] Canales RD, Luo Y, Willey JC, et al. Evaluation of DNA microarray results with quantitative gene expression platforms. *Nat Biotechnol* 2006;24:1115-22.
- [4] Shippy R, Fulmer-Smentek S, Jensen RV, et al. Using RNA sample titrations to assess microarray platform performance and normalization techniques. *Nat Biotechnol* 2006;24:1123-31.
- [5] Guo L, Lobenhofer EK, Wang C, et al. Rat toxicogenomic study reveals analytical consistency across microarray platforms. *Nat Biotechnol* 2006;24:1162-9.
- [6] Corvi R, Ahr HJ, Albertini S, et al. Meeting report: Validation of toxicogenomics-based test systems: ECVAM-ICCVAM/NICEATM considerations for regulatory use. *Environ Health Perspect* 2006;114:420-9.
- [7] Bulera SJ, Eddy SM, Ferguson E, et al. RNA expression in the early characterization of hepatotoxicants in Wistar rats by high-density DNA microarrays. *Hepatology* 2001;33:1239-58. *mer Electronics, Vol.48, No.2, pp. 366-375, 2002.*
- [8] Minami K, Saito T, Narahara M, et al. Relationship between hepatic gene expression profiles and hepatotoxicity in five typical hepatotoxicant-administered rats. *Toxicol Sci* 2005;87:296-305.
- [9] Huang Q, Jin X, Gaillard ET, et al. Gene expression profiling reveals multiple toxicity endpoints induced by hepatotoxicants. *Mutat Res* 2004;549:147-68.
- [10] Waring JF, Jolly RA, Ciurlionis R, et al. Clustering of hepatotoxins based on mechanism of toxicity using gene expression profiles. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001;175:28-42.
- [11] Ellinger-Ziegelbauer H, Stuart B, Wahle B, et al. Characteristic expression profiles induced by genotoxic carcinogens in rat liver. *Toxicol Sci* 2004;77:19-34.
- [12] de Longueville F, Atienzar FA, Marcq L, et al. Use of a low-density microarray for studying gene expression patterns induced by hepatotoxicants on primary cultures of rat hepatocytes. *Toxicol Sci* 2003;75:378-92.
- [13] Kang JS, Jeong YK, Suh SK, et al. Assessment of feasibility for developing toxicogenomics biomarkers by comparing in vitro and in vivo genomic profiles specific to liver toxicity induced by acetaminophen. *Mol & Cellular Toxicol* 2007;3:177-84.
- [14] Kang JS, Jeong YK, Shin JH, et al. Comparing in vitro and in vivo genomic profiles specific to liver toxicity induced by thioacetamide. *The J of Applied Pharm* 2007;15:252-60.
- [15] Kang JS, Yum Y, N., Han E, et al. Evaluation of potential biomarkers for thioacetamide-induced hepatotoxicity using siRNA. *The Journal of Applied Pharmacology* 2008;16:197-202.
- [16] Kang JS, Wanibuchi H, Murai T, et al. Analysis of gene expression in different stages of MeIQx-induced rat hepatocarcinogenesis. *Oncol Rep* 2007;17:747-52.
- [17] Chuma M, Sakamoto M, Yamazaki K, et al. Expression profiling in multistage hepatocarcinogenesis: identification of HSP70 as a molecular marker of early hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2003;37:198-207.
- [18] Yamashita S, Nomoto T, Abe M, et al. Persistence of gene expression changes in stomach mucosae induced by short-term N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine treatment and their presence in stomach cancers. *Mutat Res* 2004;549:185-93.
- [19] Iida M, Anna CH, Hartis J, et al. Changes in global gene and protein expression during early mouse liver carcinogenesis induced by non-genotoxic model carcinogens oxazepam and Wyeth-14,643. *Carcinogenesis* 2003;24:757-70.
- [20] Nishida K, Mine S, Utsunomiya T, et al. Global analysis of altered gene expressions during the process of esophageal squamous cell carcinogenesis in the rat: a study combined with a laser microdissection and a cDNA microarray. *Cancer Res* 2005;65:401-9.
- [21] Shan L, Yu M, Schut HA, et al. Susceptibility of rats to mammary gland carcinogenesis by the food-derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) varies with age and is associated with the induction of differential gene expression. *Am J Pathol* 2004;165:191-202.
- [22] Kuramoto T, Morimura K, Yamashita S, et al. Etiology-specific gene expression profiles in rat mammary carcinomas. *Cancer Res* 2002;62:3592-7.
- [23] Shan L, He M, Yu M, et al. cDNA microarray profiling of rat mammary gland carcinomas induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Carcinogenesis* 2002;23:1561-8.
- [24] Shan L, Yu M, Snyderwine EG. Gene expression profiling of chemically induced rat mammary gland

cancer. *Carcinogenesis* 2005;26:503-9.

[25] Sukata T, Uwagawa S, Ozaki K, et al. alpha(2)-Macroglobulin: a novel cytochemical marker characterizing preneoplastic and neoplastic rat liver lesions negative for hitherto established cytochemical markers. *Am J Pathol* 2004;165:1479-88.

[26] Michel C, Desdouets C, Sacre-Salem B, et al. Liver gene expression profiles of rats treated with clofibrilic acid: comparison of whole liver and laser capture microdissected liver. *Am J Pathol* 2003;163:2191-9.

[27] Suzuki S, Asamoto M, Tsujimura K, et al. Specific differences in gene expression profile revealed by cDNA microarray analysis of glutathione S-transferase placental form (GST-P) immunohistochemically positive rat liver foci and surrounding tissue. *Carcinogenesis* 2004;25:439-43.



강진석

1990년 : 서울대학교 수의과대학
학사

1992년 : 서울대학교 수의과대학원
(수의병리학 석사)

2006년 : 오사카시립대 의과대학원
(병리학 박사)

1992년~1998년 : (주)대웅제약 중앙연구소 선임연구원

1998년~2008년 : 식품의약품안전청 국립독성과학원

2008년~현재 : 남서울대학교 임상병리학과 조교수

관심분야 : 독성병리, 발암, 바이오디지털 콘텐츠