



게잡이 원숭이에서 Recombinant Human Erythropoietin의 4주간 투여 후 비장 유전자 발현 연구

윤석주 · 황지윤 · 임정선 · 정선영 · 김용범 · 김달현¹ · 권명상² · 한상섭 · 김충용
안전성평가연구소, ¹CJ 제약연구소, ²강원대학교 수의학과

Effects of Recombinant Human Erythropoietin Treatment in Male Cynomolgus (*Macaca fascicularis*) Monkeys (II): Gene Expression Profiling in Spleen

Seokjoo Yoon, Ji-Yoon Hwang, Jung-Sun Lim, Sun-Young Jeong, Yong-Bum Kim, Dal-Hyun Kim¹,
Myung-Sang Kwon², Sang-Seop Han and Choong-Yong Kim

Korea Institute of Toxicology, KRICT PO box 123, Yuseong, Daejeon 305-343

¹R&D Center of Pharmaceuticals, CJ Corp. Ichon, Kyunggi 467-812

²School of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Received August 8, 2005; Accepted September 14, 2005

ABSTRACT. We investigated effects of recombinant human erythropoietin (rHuEPO) on profiles of mRNA transcripts in 6 male cynomolgus (*M. fascicularis*) monkey's spleen for 4 weeks. Six monkeys, composed of control and treatment group (Control : M1, M2, M3; Treatment : M4, M5, M6) were intravenously administered 3 times per week without or with a dose of rHuEPO 2730 IU/0.1 ml/kg. After 4 weeks rHuEPO treatment, spleen was removed for RNA isolation. Splenic gene expression was assessed using Affymetrix U133A 2.0 arrays containing 18,400 transcripts and variants, including 14,500 well-characterized human genes. Gene expression pattern was very different between individuals even in same treatment. In rHuEPO treated groups showed number of genes were up- or down-regulated (M4: 79; M5: 48; M6: 73 genes). Six genes (epidermal growth factor receptor, calgranulin A, estrogen receptor binding site associated antigen, matrix metalloproteinase 19, zinc finger and BTB domain containing 16, progesterin and adipoQ receptor) were commonly expressed in rHuEPO treated group. The different individual response could be major considering factor in monkey experiment. Further study is needed to clarify the different individual response to rHuEPO in molecular level. This study will be valuable in the fundamental understanding and validation of molecular toxicology for biogeneric drugs including rHuEPO in cynomolgus monkey.

Keywords: rHuEPO, Cynomolgus monkey, Gene expression, Spleen, Microarray.

서 론

1906년에 최초로 Carnot과 Delflandre에 의해 적혈구의 생성이 호르몬과 같은 개념으로 조절된다는 이론을 발표한지 약 100년 동안 많은 연구가 진행되었다. 이 적혈구 생성을 담당하는 물질은 erythropoietin(EPO)으로 알

려졌다. EPO는 적혈구 전구세포의 분열과 분화를 촉진하는 당단백 호르몬으로서 태아 때에는 주로 간에서 생성되지만, 성숙 동물에서는 80~90% 정도가 신장에서 생성된다(Koury *et al.*, 1988; Fisher, 1993). 형성된 EPO는 혈류를 따라 이동하여 골수내 erythroid progenitor cell (CFU-E)의 특이수용체와 작용하여 이들의 분화 및 증식을 촉진함으로써 적혈구 생성을 향진시킨다(Eschbach and Adamson, 1989). EPO는 유전자재조합기술의 발달로 인하여 EPO 유전자의 재조합과 대량생산이 가능하게 되어 임상적으로 만성빈혈, 신성빈혈, 말기의 신장질환, 화학요

Correspondence to: Choong-Yong Kim, Non-human primate team, Toxicology Division, Korea Institute of Toxicology, KRICT, P.O. Box 123, Yuseong, Daejeon, Korea
E-mail : kimcy@kitox.re.kr

법에 의한 빈혈, 자가수혈등에 널리 사용되고 있다(Jacob et al., 1985; Lin et al., 1985; Fisher, 1993; Vaziri et al., 1994; Gebbia et al., 1991). 다국적 제약기업들은 포스트 지놈 시대를 맞이하여 제약시장의 주력이 기존의 화학합성 의약품에서 바이오 의약품으로 빠르게 전환되고 있으며 나아가 차세대 의약품 개발을 위한 glycomics 등 첨단 생명공학 기술을 도입하여 바이오 제네릭 제품의 당쇄를 변형시키는 차세대 의약품개발에 박차를 가하고 있으며, 이는 효능 및 안정성이 증가될 수 있는 가능성을 제시하고 있다. Amgen사는 바이오 의약품 시장에서 최고의 블록버스터인 Epogen(EPO)의 차세대 제품으로서 Aranesp를 개발 상용화하고 있다(Shriver et al., 2004). 한편 국내에서는 다양한 정부차원의 육성정책에 힘입어 1990년대에 들어 제약사들은 인터페론, 성장호르몬, EPO, 콜로니 자극인자 등 유전자 재조합 의약품을 국내 자체 기술로 개발하여 시판하고 있다(정광희, 2004). 최근 일부 제약사는 구조의 리모델링을 통한 반감기가 긴 차세대 EPO 제품개발에 주력하고 있으나 기존의 EPO 제품에 대한 설치류 및 개에서의 단백질약품의 항체형성등 안전성 평가의 한계성의 고려되고 있다. 따라서 사람과의 해부생리학적으로 유사성이 있는 원숭이를 이용한 안전성평가의 필요성이 요구되고 있고 국내 원숭이의 수요가 급속히 증가하고 있음에도 불구하고 국내에서 원숭이를 사용한 독성평가 및 분자생물학적인 기초자료가 부족한 형편이다. 본 연구에서 분자생물학적 연구의 표적장기로 비장을 선택하였다. 비장은 영장류에서 면역장기로서 중요한 장기이며 EPO 만성 투여시 비장중대의 반응을 보인다. 또한 다량의 EPO 만성투여에 의한 부작용으로 혈소판 감소증의 증상이 있다는 보고가 있다(McDonald et al., 1978).

따라서 본 연구에서는 rHuEPO 제품에 대한 원숭이의 비장에서의 유전자 발현변화를 확인함으로써 EPO 투여에 의한 분자수준의 반응을 연구하는데 필요한 기초자료를 확보하는데 목적이 있다.

재료 및 방법

공시동물

한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 영장류 연구 시험동에서 사육된 중국산 cynomolgus(*Macaca fascicularis*) monkey 로서 수컷 6마리를 이용하였다. 연령은 4~5년 생으로 체중은 평균 4.796 g이었다.

사육환경

공시동물은 온도 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 10\%$, 환기 횟수 10~20회/hr, 조명시간 12 hr(07:00 점등~19:00 소

등) 및 조도 150~300 Lux로 살내는 음압(3 mmAq 이상)으로 유지되는 조건에서 사육하였다. 동물실의 온·습도는 자동 온습도측정기에 의하여 매시간 마다 측정되었으며, 조도 등의 환경조건은 정기적으로 측정되었고, 동물실의 환경측정 결과 시험에 영향을 미칠 것으로 생각되는 변동은 없었다. 동물시험에 적용되는 모든 수순은 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소(AAALAC International 인증 획득, 1998)의 동물관리 사용위원회(IACUC)에 의해 검토되어 실시되었다.

사료 및 물

사료는 영장류 전용 고품사료(PS, Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 사육 기간 동안 1일 동물체중의 약 4%를 제한급여 하였다. 또한 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 검역실에서 미생물검사와 사료공급처에서 오염물질을 확인한 바, 본 시험에 영향을 미칠만한 요인은 발견되지 않았다. 물은 상수도수를 미세여과기와 자외선 유수살균기를 이용하여 소독시킨 후 자유섭취 시켰다. 급여 전에 일반 수질검사를 실시하여 물중의 오염물질 분석 결과 시험에 영향을 미칠만한 요인은 발견되지 않았다.

시험물질 EPO의 투여

시험물질은 recombinant human erythropoietin(rHuEPO) 제제로 골수 중의 적아구 전구세포에 작용하여 적혈구의 생성을 조절하는 조혈 호르몬제제(에포카인, CJ 종합연구소)를 사용하였고 투여용량은 2730 IU/0.1 ml/kg으로 주 3회 4주간 요추피정맥으로 투여하였다. 대조군은 수컷 3마리(M1, M2, M3)로 투여군도 수컷 3마리로 분류하였다(M4, M5, M6).

일반 혈액생화학검사를 위한 혈액을 채취하였고 조직병리학적 검사를 위하여 장기를 적출하였다. 본 실험에 사용된 비장은 RNA 분리용으로 일부를 적출하고, 즉시 RNAlater(Ambion, U.S.A.) 용액에 보관하였다. 나머지 부분은 조직병리학적검사를 위하여 10% 중성완충 포르말린 액으로 고정시켰다.

Total RNA 분리

채취한 비장 조직의 무게를 측정하고 각 중량에 맞추어 Trizol(Molecular research center, U.S.A.) 용액을 준비하였다. Polytron homogenizer(Kinematica AG, Swiss)를 이용하여 조직을 균질화하였다. 최종 분리된 RNA를 RNeasy MinElute Cleanup kit(QIAGEN, U.S.A.)를 이용하여 정제하고, 정제된 샘플은 실험에 사용하기 전까지 -80°C 에 보관하였다.

RNA quality control

Purity 측정 및 정량. 분리된 total RNA를 Nanodrop 1000(Nanodrop, U.S.A.)을 이용하여 정량하였다.

Integrity 측정. 정량을 마친 total RNA를 Agilent Bioanalyzer 2100(Agilent Technologies, U.S.A.)을 이용하여 정제된 RNA의 integrity를 확인하였다.

cDNA 및 cRNA 합성

Preparation. 분리된 RNA를 reverse transcription과정을 통해 cDNA를 합성하였다. cDNA 합성 후 동량의 phenol : chloroform : isoamyl alcohol(25 : 24 : 1)을 첨가한 후 튜브를 뒤집어 혼합하였다. 13,000 ×g로 원심분리한 후 상청액(수용액층: 150 μl)을 새로운 마이크로 튜브로 옮겼다. 여기에 시약(linear acrylamide(0.25%) 0.5 μl, 5 M ammonium acetate 150 μl(상청액과 동량))을 혼합하여 cDNA를 침전시켰다. 상청액과 5 M ammonium acetate를 합한 양의 2배인 ethanol(약 750 μl)을 첨가하고, 가볍게 혼합한 후 -20°C에서 20분 이상 방치하였다. 12000 ×g에서 원심분리한 후 ethanol을 조심스럽게 제거하였다. Pellet을 미리 -20°C로 냉각시킨 80% ethanol 500 μl로 2번 washing하고, washing 때마다 13,000 ×g에서 원심분리 하였다. Ethanol을 조심스럽게 제거한 후, 뚜껑을 열고 pellet을 건조시켰다. 적당량의 멸균 증류수로 pellet을 녹였으며, 사용 전까지 -20°C에 보관하였다.

In vitro transcription. 다음과 같은 transcription master mix(ATP (75 mM) 2.0 μl, GTP(75 mM) 2.0 μl, CTP(75 mM) 1.5 μl, UTP(75 mM) 1.5 μl, Bio-11-CTP (10 mM) 3.75 μl, Bio-16-UTP(10 mM) 3.75 μl, 10X T7 transcription buffer 2.0 μl, T7 RNA polymerase(100 unit/μl) 2.0 μl) 18.5 μl을 0.2 ml PCR 튜브에 넣었다. 준비된 cDNA(T7-promoter-tagged, ds cDNA) 1.5 μl을 넣고 가볍게 혼합하였다. 반응액을 원심분리 후 PCR 기에서 37°C에서 6시간 배양하였다.

Biotinylated RNA의 정제. 앞에서 준비한 RNA 샘플에 정제수 80 μl를 넣어 혼합한 후 새로운 튜브에 옮겼다. RLT buffer(QIAGEN, U.S.A.) 350 μl를 넣고 가볍게 혼합한 후 ethanol 250 μl를 넣고 잘 섞어주었다. 이 샘플(700 μl)을 RNeasy spin column(QIAGEN, U.S.A.)에 넣고, 상온에서 10,000 ×g로 15~20초간 원심분리하였다. 튜브를 버린 다음, 새로운 collection 튜브에 column을 옮겨 담았다. RPE buffer(QIAGEN, U.S.A.) 500 μl을 column에 넣고 상온에서 10,000 ×g로 15~20초간 원심분리한 후, 걸러진 액을 버렸다. 이 과정은 두 번 반복되었다. Spin column을 새로운 튜브에 옮긴 다음 RNase free water 50 μl을 첨가한 후 상온에서 5분간 방치하였

다. 16,000 ×g로 원심분리하였다. Hybridization kinetics를 높이고 이차구조를 줄이기 위해 biotinylated cRNA를 마그네슘 이온 존재 하에서 가열하여 35~200 bp 크기로 단편화시킨 후 hybridization 하기 전까지 -80°C에서 보관하였다.

Oligo DNA chip

본 연구에서 사용한 oligo DNA chip은 미국 Affymetrix사의 U133A 2.0 Array이다. Oligo DNA chip의 장점은 cDNA 칩에 비해 선택성이 높으며 비특이적 결합을 제거 가능하며 뛰어난 재현성을 갖고 있다.

Hybridization. Hybridization cocktail(control cRNA, bovine serum albumin, oligo B2, herring sperm DNA, target cRNA mix)을 준비하였다. U133A 2.0 Array에 200 μl의 hybridization cocktail을 주입한다. GeneChip hybridization oven 640(Affymetrix, U.S.A.)을 이용하여 45°C에서 16시간 동안 hybridization 하였다.

Washing & staining. GeneChip fluidics station 450(Affymetrix, U.S.A.)의 protocol을 이용하여 washing 하였다. Washing이 끝난 후 streptavidin phycoerythrin을 이용하여 staining 하였다.

Scanning and Data analysis.

(1) 본 시험을 위해 Affymetrix의 oligo chip인 HGU133A_2(Human Genome U133A 2.0 Array)를 사용하였다. 각 probe는 20mer로 구성되어 cDNA microarray보다 민감도와 특이성 및 재현성이 높은 것이 특징이다.

(2) Scanning: Staining이 끝난 칩을 GeneChip scanner 3000(Affymetrix, U.S.A.)을 이용하여 발현된 유전자의 intensity를 측정하였다. 75% value에 해당하는 intensity의 pixel을 통계적 대푯값으로 cell을 채워 *.CEL file로 나타내었다. 여기서 다시 이러한 통계적 값을 숫자로 표현한 *.CHP file을 이용하여 data 분석을 이행하였다.

(3) 데이터 분석

① 데이터 전처리과정

GCOS에서 제공되는 single array analysis algorithm을 이용하였으며, probe pair의 신호를 이용하여 $R = (PM - MM)/(PM + MM)$ 을 통해, 역치값 0.015 이하를 보이는 유전자는 제거하였다. Wilcoxon's signed rank test를 통하여 detection p-value를 산출하였으며, cut off value는 p-value 0.06으로 선정하였다. Scaling 된 데이터이므로 별도의 전처리는 시행하지 않았다.

② 유전자의 선별

Table 1과 같이 처리군의 각 개체별 유의하게 발현된 유전자를 선별, 총 6장의 칩실험 결과에서 M1, M2, M3

Table 1. Data analysis combination for control and rHuEPO treated monkeys

	M4	M5	M6
M1	M1 vs. M4	M1 vs. M5	M1 vs. M6
M2	M2 vs. M4	M2 vs. M5	M2 vs. M6
M3	M3 vs. M4	M3 vs. M5	M3 vs. M6

을 대조군으로 하여 실험군인 M4, M5, M6을 각각 분석하였다. GeneSpring(Agilent Technologies, U.S.A.)를 이용하여 각 군에서 1.0 이상 혹은 이하의 fold change (Log estimation w/ base 2)를 보이는 공통의 유전자로 진행하였다. Data annotation정보는 NCBI(National Center for Biotechnology Information)와 Affymetrix사의 NetAffx 분석센터를 이용하였다. 공통적으로 2배 이상의 발현변화를 보인 유전자 수는 각 군당 79, 48, 73개

이다. 위 유전자 발현의 증가/감소된 수를 Table 2에 정리하였으며 signal 평균값을 이용하여 fold change를 산출하였다.

결 과

본 연구에서는 cynomolgus monkey에 있어 4주간의 rHuEPO 투여에 대한 비장의 유전자 발현분석을 실시하였고 그 결과는 다음과 같다. 원숭이에게 rHuEPO를 투여한 뒤 비장을 DNA chip 분석용으로 적출한 뒤 RNA를 분리하여 본 실험에 적용하였다. 면역세포 생산과 혈소판 파괴의 기능을 담당하는 것으로 알려져 있는 비장에서의 유전자 발현 패턴을 분석함으로써 rHuEPO의 조절작용에 관한 영향 및 독성유발 여부에 대한 기초자료를 확보할 수 있었다.

Table 2. Gene expression numbers in rHuEPO treated monkeys (> 2 fold)

	M4			M5			M6		
Individual genes (Up & Down)	M4/M1	M4/M2	M4/M3	M5/M1	M5/M2	M5/M3	M6/M1	M6/M2	M6/M3
	861	984	524	986	881	512	1208	994	500
Common genes	79 genes			48 genes			73 genes		

Table 3. Up- and down-regulated splenic genes expression following exposure of male cynomolgus monkey (M4) to 4 weeks rHuEPO treatment (> 2 fold)

	Fold change	Gene title	Gene symbol	Probe set ID
Up regulation	3.882	neuropeptide Y receptor Y5	NPY5R	207400_at
	3.318	immunoglobulin heavy constant alpha 1	IGHA1	217022_s_at
	2.907	KIAA0182 protein	KIAA0182	212057_at
	2.833	immunoglobulin heavy constant alpha 1	IGHA1	211868_x_at
	2.584	wingless-type MMTV integration site family, member 5A	WNT5A	205990_s_at
	2.548	lipocalin 7	LCN7	219058_x_at
	2.383	immunoglobulin heavy constant delta	IGHD	214973_x_at
	2.281	rabphilin 3A-like	RPH3AL	221614_s_at
	2.276	androgen receptor	AR	211110_s_at
	2.254	major histocompatibility complex, class II, DR beta 4	HLA-DRB4	209728_at
	2.239	homeo box A5	HOXA5	213844_at
	2.223	FOS-like antigen 2	FOSL2	205409_at
	2.213	Notch homolog 2 (Drosophila)	NOTCH2	210756_s_at
	2.189	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	GADD45A	203725_at
	2.138	peroxisomal biogenesis factor 14	PEX14	33760_at
	2.137	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11	PTPN11	209895_at
	2.104	Ets2 repressor factor	ERF	203643_at
	2.039	all-trans-13,14-dihydroretinol saturase	RetSat	218124_at
	1.904	heat shock 22 kDa protein 8	HSPB8	221667_s_at
	1.867	hemochromatosis	HFE	211332_x_at
	1.840	wingless-type MMTV integration site family, member 5A	WNT5A	213425_at
	1.770	thymopoietin	TMPO	209754_s_at
	1.394	neurofilament, heavy polypeptide 200 kDa	NEFH	33767_at
1.381	splicing factor, arginine/serine-rich 5	SFRS5	210077_s_at	
1.269	hemoglobin, gamma A	HBG1	204848_x_at	
1.262	hemoglobin, gamma A	HBG1	213515_x_at	
1.160	hemoglobin, gamma A	HBG1	204419_x_at	

Table 3. Continued

	Fold change	Gene title	Gene symbol	Probe set ID
Down regulation	0.208	S100 calcium binding protein A8	S100A8	202917_s_at
	0.262	integral membrane protein 2A	ITM2A	202747_s_at
	0.281	intercellular adhesion molecule 3	ICAM3	204949_at
	0.290	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A	LILRA1	210660_at
	0.298	glutaredoxin	GLRX	206662_at
	0.298	Trophoblast-derived noncoding RNA	TncRNA	214657_s_at
	0.308	amyotrophic lateral sclerosis 2 chromosome region, candidate 3	ALS2CR3	202124_s_at
	0.318	ribosomal protein S2	RPS2	212433_x_at
	0.322	heat shock transcription factor 1	HSF1	213756_s_at
	0.326	dual adaptor of phosphotyrosine and 3-phosphoinositides	DAPP1	219290_x_at
	0.337	TRAF3-interacting Jun N-terminal kinase-activating modulator	T3JAM	205804_s_at
	0.345	cell division cycle 27	CDC27	217878_s_at
	0.378	glycine amidinotransferase	GATM	203178_at
	0.385	stromal antigen 1	STAG1	202293_at
	0.388	chondroitin sulfate proteoglycan 2	CSPG2	221731_x_at
	0.396	nebulette	NEBL	203962_s_at
	0.408	protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide	PRKDC	210543_s_at
	0.410	chromosome 9 open reading frame 10	C9orf10	200767_s_at
	0.412	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 9 eta, 116 kDa	EIF3S9	211501_s_at
	0.418	hypothetical protein MGC21416	MGC21416	212343_at
	0.419	chromosome X open reading frame 21	CXorf21	220252_x_at
	0.422	TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein	TIA1	201447_at
	0.429	eukaryotic translation initiation factor 5B	EIF5B	201027_s_at
	0.431	E1A binding protein p300	EP300	213579_s_at
	0.434	Fas apoptotic inhibitory molecule	FAIM3	221602_s_at
	0.435	karyopherin alpha 1	KPNA1	213741_s_at
	0.442	---	---	213109_at
	0.453	a disintegrin and metalloproteinase domain 10	ADAM10	202604_x_at
	0.457	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide E, 25 kDa	POLR2E	217854_s_at
	0.458	integrin, beta 2 (antigen CD18 (p95))	ITGB2	202803_s_at
	0.462	hypothetical protein HSPC016	HSPC016	221791_s_at
	0.468	cyclin H	CCNH	204093_at
	0.470	SET translocation (myeloid leukemia-associated)	SET	215780_s_at
	0.480	latent transforming growth factor beta binding protein 1	LTBP1	202729_s_at
	0.490	mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (<i>E. coli</i>)	MSH2	209421_at
	0.499	Aldehyde dehydrogenase 7 family, member A1	ALDH7A1	208951_at
	0.518	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 (2H9)	HNRPH3	210110_x_at
	0.520	DiGeorge syndrome critical region gene 6	DGCR6	208024_s_at
	0.523	adducin 3 (gamma)	ADD3	201752_s_at
	0.538	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 1	B4GALT1	216627_s_at
	0.540	adenosine A2a receptor	ADORA2A	205013_s_at
	0.540	periostin, osteoblast specific factor	POSTN	210809_s_at
0.563	synuclein, alpha	SNCA	204466_s_at	
0.568	bridging integrator 3	BIN3	222199_s_at	
0.575	high-mobility group nucleosomal binding domain 2	HMGN2	208668_x_at	
0.590	ribosomal protein S2	RPS2	203107_x_at	
0.595	ataxin 10	ATXN10	208833_s_at	
0.599	transcriptional regulator protein	HCNGP	217965_s_at	
0.711	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2 interacting protein	NFATC2IP	212809_at	
0.889	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1	HLA-DQA1	203290_at	
0.900	aminolevulinate, delta-, synthase 2	ALAS2	211560_s_at	
0.979	N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase-like 1	NAALADL1	207895_at	

Table 4. Up- and down-regulated splenic genes expression following exposure of male cynomolgus monkey (M5) to 4 weeks rHuEPO treatment (> 2 fold)

	Fold change	Gene title	Gene symbol	Probe set ID
Up regulation	3.258	estrogen receptor binding site associated, antigen, 9	EBAG9	204274_at
	2.842	KIAA1102 protein	KIAA1102	212325_at
	2.527	actin related protein 2/3 complex, subunit 4, 20 kDa	ARPC4	217817_at
	2.517	actin related protein 2/3 complex, subunit 4, 20 kDa	ARPC4	217818_s_at
	2.494	neuropilin 1	NRP1	212298_at
	2.453	hypothetical protein FLJ14213	FLJ14213	219383_at
	2.428	WAP four-disulfide core domain 1	WFDC1	219478_at
	2.427	IgM VDJ-region /// IgM VDJ-region	---	211908_x_at
	2.422	fms-related tyrosine kinase 1	FLT1	210287_s_at
	2.301	membrane-associated ring finger (C3HC4) 1	---	219574_at
	2.280	vaccinia related kinase 3	VRK3	218022_at
	2.211	Ras-related GTP binding D	RRAGD	221523_s_at
	2.144	IgG to Puumala virus G2, light chain variable region	---	217258_x_at
	2.121	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L5	UCHL5	219960_s_at
	2.083	zinc finger protein 292	ZNF292	212366_at
	2.041	connective tissue growth factor	CTGF	209101_at
	2.039	splicing factor, arginine/serine-rich 5	SFRS5	210077_s_at
	2.024	FXFD domain containing ion transport regulator 1	FXFD1	205384_at
	1.992	sterol O-acyltransferase	SOAT1	221561_at
	1.953	immunoglobulin lambda constant 1 (Mcg marker)	IGLC1	216430_x_at
	1.953	thymopoietin	TMPO	209754_s_at
	1.832	WW domain containing transcription regulator 1	WWTR1	202133_at
	1.813	wingless-type MMTV integration site family, member 5A	WNT5A	205990_s_at
	1.693	Phosphoinositide-3-kinase, class 2, alpha polypeptide	PIK3C2A	213070_at
	1.364	immunoglobulin heavy constant alpha 1	IGHA1	217022_s_at
	Down regulation	0.159	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	HLA-DQB1
0.235		CD74 antigen	CD74	209619_at
0.259		tenascin C (hexabrachion)	TNC	201645_at
0.279		major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	HLA-DQB1	211654_x_at
0.329		diablo homolog (Drosophila)	DIABLO	219350_s_at
0.376		dual adaptor of phosphotyrosine and 3-phosphoinositides	DAPP1	219290_x_at
0.408		suppressor of cytokine signaling 5	SOCS5	208127_s_at
0.411		Integrin, beta 5	ITGB5	214020_x_at
0.433		docking protein 1, 62 kDa (downstream of tyrosine kinase 1)	DOK1	216835_s_at
0.454		myosin IF	MYO1F	213733_at
0.456		SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1	SMARCE1	211988_at
0.462		protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform	PPP1CB	201409_s_at
0.472		cyclin A2	CCNA2	203418_at
0.483		membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1	MS4A1	217418_x_at
0.484		RNA binding motif, single stranded interacting protein 2	RBMS2	34187_at
0.496		chemokine (C-C motif) ligand 19	CCL19	210072_at
0.514		Ataxia telangiectasia mutated	ATM	212672_at
0.538		fibronectin 1	FN1	211719_x_at
0.585		thrombospondin 1	THBS1	201109_s_at
0.587		SET translocation (myeloid leukemia-associated)	SET	215780_s_at
0.589		interferon stimulated gene 20 kDa	ISG20	33304_at
0.666		solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 1	SLC20A1	201920_at
0.738		hemoglobin, gamma A	HBG1	213515_x_at

투여군 개체인 M4, M5, M6은 대조군과 비교해서 (Table 1) 각각 79, 48, 73개의 유전자가 증감하였다 (Table 2). M4 개체에서는 Integrin, Thiotransferase,

Thymopoietin, Protein tyrosine phosphatase 등에 변화가 있었다. M5에서는 Thrombospondin 1, Neutropilin 1, Cyclin A2 등이 변화하였다. M6의 경우에는 Stomatin,

Laminin, Lipoprotein lipase 등의 유전자가 변화하였다 (Tables 3, 4, 5). 같은 물질을 투여한 개체사이에서도 유전자 발현패턴은 각각 개체 특이적으로 나타났다.

처리군(M4, M5, M6)에서 공통적으로 발현된 유전자 6

개에 불과했다(Table 6). Fig. 1에서 볼 수 있듯이 공통적으로 발현된 유전자중 M4의 경우에는 전체적으로 감소하는 경향을 보이고 M5, M6의 경우는 대부분 증가하는 패턴을 보였다. 혈액생화학적으로 M4, 5, 6은 거의 모든 혈

Table 5. Up- and down-regulated splenic genes expression following exposure of male cynomolgus monkey (M6) to 4 weeks rHuEPO treatment (> 2 fold)

	Fold change	Gene title	Gene symbol	Probe set ID
Up regulation	6.742	immunoglobulin heavy constant alpha 1	IGHA1	217022_s_at
	3.936	connective tissue growth factor	CTGF	209101_at
	3.503	major histocompatibility complex, class II, DR beta 4	HLA-DRB4	209728_at
	3.042	lipoprotein lipase	LPL	203549_s_at
	2.963	four and a half LIM domains 1	FHL1	210299_s_at
	2.799	estrogen receptor binding site associated, antigen, 9	EBAG9	204274_at
	2.738	family with sequence similarity 18, member B	FAM18B	218446_s_at
	2.654	restin RSN210716_s_at2.654 C-type lectin domain family 4, member A	CLEC4A	219947_at
	2.632	cannabinoid receptor 1 (brain)	CNR1	213436_at
	2.625	Ras interacting protein 1	RASIP1	220027_s_at
	2.521	chromosome 18 open reading frame 25	C18orf25	217508_s_at
	2.499	Nuclear factor I/B	NFIB	213033_s_at
	2.489	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	ACTG2	202274_at
	2.446	WAP four-disulfide core domain 1	WFDC1	219478_at
	2.443	potassium channel tetramerisation domain containing 12	KCTD12	212192_at
	2.336	laminin, beta 1	LAMB1	201505_at
	2.316	chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	CSPG2	215646_s_at
	2.241	tetraspanin 13	TSPAN13	217979_at
	2.216	KIAA0776	KIAA0776	212633_at
	2.215	monoamine oxidase A	MAOA	204389_at
	2.149	putative insulin-like growth factor II associated protein	LOC492304	202409_at
	2.123	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L5	UCHL5	219960_s_at
	2.122	Ngg1 interacting factor 3 like 1 binding protein 1	NIF3L1BP1	218334_at
	2.115	cofactor required for Sp1 transcriptional activation, subunit 2	CRSP2	202611_s_at
	2.106	Nexilin (F actin binding protein)	NEXN	212847_at
	2.094	zinc finger protein 444	ZNF444	218707_at
	2.056	solute carrier family 25, member 24	SLC25A24	204342_at
	2.028	abl-interactor 1	ABI1	209028_s_at
	2.016	Phosphoinositide-3-kinase, class 2, alpha polypeptide	PIK3C2A	213070_at
	2.014	neuropilin 1	NRP1	212298_at
	1.979	carbonic anhydrase I	CA1	205949_at
	1.963	Solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1	SLC30A1	212907_at
	1.931	WW domain binding protein 4 (formin binding protein 21)	WBP4	203599_s_at
	1.895	N-myc downstream regulated gene 1	NDRG1	200632_s_at
	1.875	stomatin	STOM	201061_s_at
	1.797	capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 2	CAPZA2	201237_at
	1.763	Hypothetical protein MGC27165	MGC27165	215118_s_at
	1.755	Rab geranylgeranyltransferase, alpha subunit	RABGGTA	203573_s_at
	1.750	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11	PTPN11	209895_at
	1.667	TSPY-like 1	TSPYL1	221493_at
	1.652	splicing factor, arginine/serine-rich 5	SFRS5	210077_s_at
	1.643	vacuolar protein sorting 54 (yeast)	VPS54	218423_x_at
	1.598	potassium channel tetramerisation domain containing 3	KCTD3	217894_at
	1.546	caspase recruitment domain family, member 4	CARD4	221073_s_at
	1.540	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	S100A8	202917_s_at
	1.371	wingless-type MMTV integration site family, member 5A	WNT5A	205990_s_at
	1.111	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1	HLA-DQA1	203290_at

Table 5. Continued

	Fold change	Gene title	Gene symbol	Probe set ID
Down regulation	0.277	profilin 1	PFN1	200634_at
	0.279	hematopoietically expressed homeobox	HHEX	204689_at
	0.281	CD6 antigen /// CD6 antigen	CD6	213958_at
	0.326	integral membrane protein 2A1	TM2A	202747_s_at
	0.336	nebulette	NEBL	203962_s_at
	0.357	glycine amidinotransferase	GATM	203178_at
	0.370	macrophage receptor with collagenous structure	MARCO	205819_at
	0.377	SNARE protein Ykt6	YKT6	217785_s_at
	0.387	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia	MLLT10	216509_x_at
	0.424	hypothetical protein MGC10433	MGC10433	205740_s_at
	0.430	chromosome 6 open reading frame 82	C6orf82	221488_s_at
	0.440	transcription factor B1, mitochondrial	TFB1M	219169_s_at
	0.455	midkine (neurite growth-promoting factor 2)	MDK	209035_at
	0.455	nudE nuclear distribution gene E homolog 1 (A. nidulans)	NDE1	218414_s_at
	0.472	SET translocation (myeloid leukemia-associated)	SET	215780_s_at
	0.473	hypothetical protein FLJ20152	FLJ20152	218532_s_at
	0.476	alanyl-tRNA synthetase	AARS	201000_at
	0.481	general transcription factor IIF, polypeptide 1, 74 kDa	GTF2F1	202354_s_at
	0.488	CD3D antigen, delta polypeptide (TIT3 complex)	CD3D	213539_at
	0.490	arginyl aminopeptidase (aminopeptidase B)	RNPEP	208270_s_at
	0.491	prostatic binding protein	PBP	205353_s_at
	0.508	casein kinase 1, gamma 1	CSNK1G1	221673_s_at
	0.543	splicing factor, arginine/serine-rich 10	SFRS10	210180_s_at
	0.554	chromosome 13 open reading frame 18	C13orf18	219471_at
	0.627	eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon 1	EEF1E1	204905_s_at

Table 6. List of commonly expressed genes in rHuEPO treated cynomolgus monkey's spleen

Probe set I	DM4 Fold changed	M5 Fold changed	M6 Fold changed	Gene title	GO Molecular Function Description	Pathway
201983_s_at	0.567	3.186	4.158	epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)	ATP binding /// epidermal growth factor receptor activity /// receptor activity /// transferase activity	—
202917_s_at	0.410	4.755	3.030	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	calcium ion binding	—
204274_at	1.000	3.994	3.431	estrogen receptor binding site associated, antigen,	apoptotic protease activator activity	—
204575_s_at	1.000	2.289	2.290	matrix metalloproteinase 19	hydrolase activity /// metalloendopeptidase activity	Matrix Metalloproteinase
205883_at	0.470	2.402	3.680	zinc finger and BTB domain containing 16	general RNA polymerase II transcription factor activity	—
213372_at	0.947	2.249	2.275	progesterin and adipoQ receptor family	---	---

액생화학적 데이터에서 유사한 수치를 보이고 있으나 산호성 백혈구, 염기호성 백혈구, 림프구의 면역관련 세포들의 수치의 개체차가 심한 것으로 나타났다. 공통된 유전자의 증감의 개체차에 대해서는 더 많은 분석과 연구가 필요하다. 투여 군에서 발현된 유전자를 gene ontology 별로 분석하여 결과를 Table 7에 나타내었다. Gene ontology에 따른 유전자 분류와 투여군의 경우에도 투여

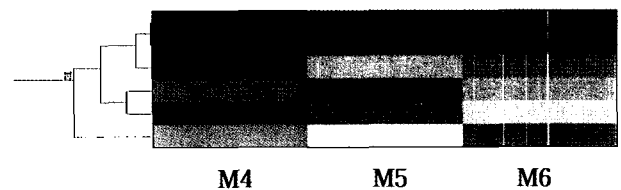
**Fig. 1.** Clustering analysis of commonly expressed genes in rHuEPO treated cynomolgus monkey's spleen ($p < 0.01$).

Table 7. rHuEPO treatment effects on a gene ontology in cynomolgus monkey's spleen

Cluster name	Ranking	Biological process	Cellular component	Molecular function
M4	1	cell death	cytosol	antigen binding
	2	death	hemoglobin complex	ligand-regulated transcription factor activity
	3	response to biotic stimulus	eukaryotic 43S preinitiation complex	protein binding
	4	response to stimulus	nucleus	binding
	5	immune response	intracellular	oxygen transporter activity
M5	1	immune response	extracellular space	antigen binding
	2	response to biotic stimulus	phosphoinositide 3-kinase complex	heparin binding
	3	defense response	cytosol	glycosaminoglycan binding
	4	organismal physiological process	extracellular region	polysaccharide binding
	5	regulation of cell growth	cell fraction	enzyme inhibitor activity
M6	1	protein complex assembly	soluble fraction	glycosaminoglycan binding
	2	cell growth	actin cytoskeleton	polysaccharide binding
	3	regulation of cell size	cellular_component	pattern binding
	4	behavior	cell fraction	carbohydrate binding
	5	growth	plasma membrane	heparin binding

군에 따른 상위 랭크된 유전자의 그룹이 서로 다를 수 있다.

고 찰

본 연구에서 rHuEPO에 의한 분자생물학적인 변화를 관찰하기 위해서 비장을 선택한 이유는 골수샘플을 대체할 수 있다고 판단하였기 때문이다. 골수샘플은 다량으로 확보하기가 어려울 뿐더러 병리조직학적인 관찰이 우선되었으며 또한 채취과정의 여러 가지 요인에 의해 순수한 RNA의 확보가 어렵다. 이에 차선택으로 선택되어진 것이 비장이다. 비장은 영장류의 성체에서 주로 면역관련 장기로서 역할을 담당하며 노쇠한 적혈구의 파괴 등의 조절과 관련된 기능을 갖고 있는 장기이다. 실제로 마우스에 EPO를 투여하였을 때 비장이 종대되는 등 직접적인 반응을 보이기도 한다. 적혈구의 증감과 혈소판의 변화는 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되고 있다(Jackson *et al.*, 1974; Karpatkin *et al.*, 1974). 원숭이의 경우는 EPO를 장기간 투여하였을 때 혈소판이 증가된 것으로 보고되었다(Furuno *et al.*, 1990). 사람의 임상실험에서도 치료제로서 EPO를 투여하였을 때 혈소판이 크게 증가된 보고가 있다(Beguin *et al.*, 1994; Eschbach *et al.*, 1989). 본 연구에서도 rHuEPO의 투여에 의해 비장의 크기가 증가하였으며 혈소판도 증가하였다. 이러한 반응은 사람에서의 반응과 유사하다고 생각되어진다. rHuEPO 투여에 의한 주요장기무게의 변화도 관찰되었다. 비장의 경우는 대조군이 체중에 대한 비율이 평균값 0.097%인 것에 반해 투여군은 0.179%였다. 간장도 대조군이 체중에 대해 1.313%이고 투여군은 1.771%로 증가하였다. EPO를 주

로 생산하는 신장의 경우도 대조군은 체중에 대해 0.304%에 반해 투여군은 0.406%로 증가하였다. 주요장기의 무게 증가에 따른 생화학 및 분자생물학적인 연관성은 분석 중에 있다. 증가한 조직의 무게와 기능적 활성화의 관계를 규명하는 것도 중요한 부분으로 생각되어진다. 또한 본 연구에서 얻어진 혈액생화학적 데이터와 발현된 유전자와의 상관관계도 더 많은 분석이 필요하다. 사람과 생리학적 구조가 가장 유사한 영장류를 이용하여 독성시험을 수행하는 것은 독성평가에 있어 매우 중요한 의미를 갖는다. 그 이유는 인체에 화학 물질 등을 직접 적용할 수 없는 상황에서 설치류나 다른 실험동물에서 생산되는 시험결과에 비해 영장류의 시험결과는 인체 반응에 가장 가까운 결과를 유추할 수 있기 때문이다. 하지만 원숭이의 경우에는 지금까지 주로 사용되어 왔던 실험동물(랫드, 마우스 등)과는 다르게 실험결과에 상당한 개체차가 있는 것이 큰 문제점으로 여겨지고 있다. 랫드나 마우스의 경우는 육종학적으로 잘 관리되고 사육환경도 태생기 부터 관리되어지므로 개체차가 현저히 작게 나타나고 있다. 원숭이의 경우에는 야생에서 포획 후 번식농장의 잘 정비된 사육환경에서 관리가 되어 지지만, 포획이전의 생활환경에 대해서는 파악이 어려운 것이 현 실정이다. 본 연구결과에서도 같은 물질을 투여한 그룹에서 공통적으로 발현된 유전자는 6개(Table 6)에 불과하였고, 공통적으로 발현된 유전자도 2개체는 유전자 발현이 증가되는 경향을 보이고 나머지 한 개체는 감소하는 경향을 보였다(Fig. 1). Gene ontology 별로 분석한 결과도 상당한 개체간의 차이를 확인할 수 있었다(Table 7). 이러한 개체차를 극복하기 위해서는 원숭이 각각의 유전적인 정보를 확보하는 것이 한 방법이라고 생각된다. 본 연구결과에서 얻어진 원

승이 비장의 유전자 발현 정보는 인체에서의 반응을 예측할 수 있는 귀중한 결과라 할 수 있다. 추후 진행될 연구에서는 realtime PCR을 이용한 관련 유전자 발현분석을 통해 물질특이적 혹은 개체특이적 유전자 분석 연구과 2D gel 분석을 이용한 단백질 발현분석 연구가 수행될 예정이다.

본 연구에서 수행한 원숭이의 비장에서의 유전자 발현 분석은 그 동안 수행되어 온 혈액생화학, 조직 병리학 데이터와 함께 독성평가에 사용될 수 있는 기초자료를 확보할 수 있다는 차원에서 큰 의미를 둘 수 있다. 이러한 데이터는 원숭이에서의 독성평가지 발생하는 개체차를 극복할 수 있는 유전학 및 분자생물학적인 기초자료로서 활용될 수 있다고 생각된다.

감사의 글

본 논문은 식품의약품안전청(05132독성평642, 영장류를 이용한 일반독성평가기술확립, 2005)지원에 의해 수행되었으며, 영장류 독성시험수행에 수고해 주신 이필수, 임선택, 박남수 선생님께 감사드립니다.

참고문헌

- Beguín, Y., Loo, M. and R'Zik, S. (1994) Effect of recombinant human erythropoietin on platelets in patients with anemia of renal failure: correlation of platelet count with erythropoietic activity and iron parameters. *Eur. J. Haematol.*, **53**, 265-270.
- Eschbach, J.W., Abdulhadi, M.H. and Browne, J.K. (1989) Recombinant human erythropoietin in anemic patients with end-stage renal diseases. Results of a phase III multicenter clinical trial. *Ann. Intern. Med.*, **111**, 992-1000.
- Eschbach, J.W. and Adamson, J.W. (1989) Guidelines for recombinant human erythropoietin therapy. *Am. J. Kidney Dis.*, **14**, 1,2-8.
- Fisher, J.W. (1993) Recent advances in erythropoietin research. *Prog. Drug Res.*, **41**, 293-311.
- Furuno, T., Komatsu, H., Noguchi, N., Noguchi, G., Suzuki, S., Kataoka, S., Saito, K., Tatsumi, T. and Usami, M. (1990) Thirteen-week intravenous toxicity study of EPOCH in Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *J. Clin. Ther. Med.*, **6**, 271-289.
- Gebbia, V., Palmeri, S., Valenza, R., Rausam, L. and Citarella, P. (1991) The *in vivo* effects of recombinant human erythropoietin on cisdiamminodichloroplatinum-induced anemia in Golden Syrian hamsters. *In Vivo*, **5**, 149-152.
- Jackson, C.W., Simone, J.V. and Edwards, C.C. (1974) The relationship of anemia and thrombocytosis. *J. Lab. Clin. Med.*, **84**, 357-368.
- Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neil, S.D., Kaufman, R.J., Mufson, A., Seehra, J., Jones, S.S., Hewick, R., Fretch, E.F., Kawakita, M., Shimizu, T. and Miyake, T. (1985) Isolation and characterization of genomics and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature*, **313**, 806-810.
- Karpatkin, S., Garg, S.K. and Freedman, M.L. (1974) Role of iron as a regulator of thrombopoiesis. *Am. J. Med.*, **57**, 521-525.
- KHIDI (2004) 유전자재조합 의약품 연구동향. *Trends in Health Industry & Technology*, Fall 30-38.
- Koury, S.T., Bondurant, M.C. and Koury, M.J. (1988) Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by *in situ* hybridization. *Blood*, **71**, 524-527.
- Lin, F.K., Suggs, S., Kin, C.H., Browne, J.K., Smalling, R., Egrie, J.C., Cjen, K.K., Fox, G.M., Martin, F., Stabinsky, Z., Badrawi, S.M., Lai, P.H. and Goldwasser, E. (1985) Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7580-7584.
- McDonald, T.P., Cottrell, M.B. and Clift, R.E. (1978) Effects of short-term hypoxia on platelet counts of mice. *Blood*, **51**, 165-170.
- McDonald, T.P., Cottrell, M.B., Steward, S.A., Clift, R.E., Swearingen, C.J. and Jackson, C.W. (1992) Comparison of platelet production in two strains of mice with different model megakaryocyte DNA ploidies after exposure to hypoxia. *Exp. Hematol.*, **20**, 51-58.
- Shriver, Z., Raguram, S. and Sasisekharan, R. (2004) Glycomics: A pathway to a class of new and improved therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, **3**, 863-873.
- Vaziri, N.D., Zhou, X.J. and Liao, S.Y. (1994) Erythropoietin enhances recovery from cisplatin-induced acute renal failure. *Am. Physiol. Soc.*, **266**, F360-366.