

한국인에서 약물 수송체의
유전자변이 및 기능변동

연세대학교 대학원
의과학과
최지하

한국인에서 약물 수송체의 유전자변이 및 기능변동

지도교수 김 경 환

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2005년 12월 일

연세대학교 대학원

의과학과

최 지 하

최지하의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2005년 12월 일

감사의 글

약리학교실에 들어온 지 어느덧 4년이 지나 이제 졸업이라는 작은 결실을 맺게 되었습니다.

먼저 저에게 연구와 공부를 할 기회를 주시고, 4년 동안 변함없는 관심으로 저의 연구를 지도해 주신 김경환 교수님께 깊이 감사를 드립니다.

그리고 연구하는 동안 제게 정말 많은 조언을 주시고, 연구자로서의 모범을 몸소 보여주신 이민구 교수님께 깊이 감사드립니다.

또한 연구뿐만 아니라 모든 일을 열심히 하시는 약리학교실의 안영수 교수님, 김동구 교수님, 김혜영 교수님, 장정원 교수님께 모두 감사드립니다.

부족한 점이 많은 저에게 임상 약리학이라는 새로운 분야의 학문을 공부할 기회를 주신 약리학교실 박경수 교수님과 소아과학교실 박민수 교수님께 정말 감사드립니다.

교실 내의 모든 대소사를 챙기시느라 항상 애쓰시는 임종수 선생님, 김건태 선생님, 민선해 언니께 매우 감사드립니다.

너무 재미있고 열정적으로 강의를 하셔서 저에게 처음으로 약리학이라는 학문에 흥미를 갖도록 해주신 이화의대 약리학교실 이경은 교수님께 정말 감사드립니다.

환자 샘플을 주셔서 이번 연구를 할 수 있게 해 주신 내과학교실 전재운 교수님, 한광협 교수님, 송시영 교수님, 안상훈 교수님과 가톨릭의대 내과학교실 안병민 교수님께 감사드립니다. 교수

님들의 도움이 없었더라면 제 연구는 시작하지 못했을 것입니다.

제 논문을 꼼꼼히 보시고 많은 조언을 주신 해부학교실 김명희 교수님, 병리학교실 조남훈 교수님께 감사드립니다.

또한 제가 약리학교실 학생인데도 항상 귀찮아하지 않으시고 저의 연구에 관심을 보이시고 도움을 주신 미생물학교실 이재면 교수님, 생화학교실 김하일 선생님, 박상규 선생님, 중문의대 미생물학교실 최용준 교수님께 감사드립니다.

아무것도 모르던 저에게 실험을 처음 가르쳐 주시느라 정말 고생을 많이 하신 추상희 선생님과 김주영 선생님께 감사드립니다.

대학원 생활을 하는 동안 저에게 많은 조언과 활력을 준 이진우 선생님, 한원선 언니, 이정호에게 감사합니다.

4년 동안 동고동락한 랩1 친구들과 사랑스러운 랩5 친구들(현정, 성복, 효선, 윤정)한테 감사합니다. 특히 저의 연구를 많이 도와준 이지현, 지현영에게 감사합니다.

제가 모교인 이화의대를 떠나 연세의대에서 새로운 생활을 시작할 때, 별 어려움 없이 잘 적응하게 도와준 여러 기초 전공의 선배님들과 동기들에게 감사드립니다.

끝으로 의학 공부를 시작한 이래 10년 동안 헌신적으로 저를 뒷바라지해 주시고 항상 저를 믿어주신 부모님과 오빠에게 깊은 사랑과 감사를 포함합니다.

2005년 12월 최지하

차 례

국문 요약	1
I. 서론	2
II. 대상 및 방법	7
1. 대상 및 시료	7
2. 유전자 분석	7
3. 변이 클론 제작	8
4. Immunoblotting	8
5. MDR 및 MRP 유전자 기능 측정	9
6. 역전사 중합효소 연쇄 반응	10
7. MRP2 promoter plasmid 제작	10
8. Luciferase 활성 측정	11
9. 젤 지연 분석법	12
III. 결과	13
1. 독성 간염 환자의 임상적 특성	13
2. 한국인에서의 MDR1, MRP2 및 MRP3 유전자 변이	16
3. MDR1, MRP2 및 MRP3 변이 유전자의 기능	21
4. MRP2 변이 유전자의 단백질 발현	22
5. MRP2 유전자 변이가 splicing에 미치는 영향	23
6. MRP2 변이 유전자의 luciferase 활성	24
7. MRP2 유전자의 promoter 변이 부위에 결합하는 전사조절 인자	26
IV. 고찰	27
V. 결론	30
참고문헌	32
영문요약	38

그림 차례

그림1. TDGS 분석법을 이용한 MRP2 유전자 변이	17
그림2. MRP2 변이 유전자의 기능	21
그림3. MRP2 변이 유전자의 MRP2 단백 발현	22
그림4. MRP2 유전자의 exon4에 대한 중합효소 연쇄 반응	23
그림5. MRP2 유전자의 promoter 변이 일배체형의 luciferase 활성	24
그림6. 간 독성을 일으키는 약물에 의한 MRP2 유전자의 promoter 변이 일배체형의 luciferase 활성 변화	25
그림7. MRP2 유전자 promoter 부위 -1774G/del 변이 부위에 결합하는 전사조절 인자	26

표 차례

표1. 독성 간염 환자의 간 손상 형태, 성별 및 연령 에 따른 분포	14
표2. 원인 약물에 따른 독성 간염 환자의 분포 . . .	15
표3. RUCAM 점수에 따른 독성 간염 환자의 분포 .	15
표4. MDR1의 유전자 변이	18
표5. MRP3의 유전자 변이	18
표6. MRP2의 유전자 변이	19
표7. MRP2 유전자의 주요 일배체형	20

한국인에서 약물 수송체의 유전자변이 및 기능변동

동일한 약물 및 용량에 대한 개체 간의 다양한 약물 반응은 주로 약물 대사 효소와 약물 수송체의 유전적 차이에 기인한다. 본 연구에서는 체내의 약물 역동에 중요한 역할을 한다고 알려진 약물 수송체 중 MDR1, MRP2, MRP3의 유전자 변이를 찾고자 하였으며 이들 변이 유전자의 기능 검색을 통하여 독성 간염 발병과 이들 유전자 변이와의 상관성 여부를 알아보고자 하였다.

유전자 분석 결과 정상인과 독성 간염 환자 간에 MRP2 유전자 일배체형이 빈도 상 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 또 일배체형을 구성하는 변이 중 promoter 부위의 변이가 중요한 작용을 할 것이라는 것을 유추할 수 있었다. Luciferase 분석법을 통하여 promoter의 기능을 측정한 결과 ‘간세포형’ 독성 간염 환자와 ‘담즙정체형/혼합형’ 독성 간염 환자에서 유의한 빈도 차이를 보인 GATG, (-)GCG 일배체형의 기능이 wild type 일배체형에 비해 현저히 감소하였다. 특히 (-)GCG 일배체형은 간 독성을 일으키는 chenodeoxycholic acid 약물을 처리한 후 promoter 활성 증가 정도도 wild type 일배체형에 비해 적었다. 이와 같이 promoter 활성이 감소된 변이를 가진 개체는 MRP2에 의한 담즙관으로의 약물 및 담즙산 등의 배출 능력이 떨어지기 때문에 동일한 약물 및 용량에 의해서도 정상인보다 더 쉽게 간 손상이 초래될 것이다.

본 연구 결과 MRP2 유전자는 독성 간염과 관련성이 높으며 특히 이에는 promoter 부위의 활성이 중요하다고 생각된다.

핵심 되는 말 : MDR, MRP, 유전자 변이, 독성 간염, 일배체형, promoter

한국인에서 약물 수송체의 유전자변이 및 기능변동

<지도교수 김경환>

연세대학교 대학원 의과학과

최 지 하

I. 서론

같은 약물을 동일한 용량으로 투여하는 경우 대부분의 사람들에서는 비슷한 치료 효과를 얻을 수 있지만 일부 사람들에서는 효과가 나타나지 않거나 심각한 부작용이 나타난다. 이와 같이 약물에 대한 반응이 개체 간에 다르게 나타나는 이유로 환자의 나이, 몸무게, 성별, 간 기능, 영양 상태 등 다양한 요소들을 고려할 수 있겠다. 최근에는 유전적 요인의 중요성이 인정되면서 약물 대사 효소, 약물 수송체 등 체내의 약물 역동에 관여하는 인자의 유전적 차이가 약물 반응 변동 요인으로 제시되고 있다. 현재까지 약물 대사 효소의 유전자 변이에 따른 약물 반응의 차이는 비교적 많이 연구되었으나, 약물 수송체의 유전적 변이와 약물 반응과의 상관성에 대한 연구는 아직 시작 단계라 할 수 있다.¹

다중약물 저항성 단백질(multidrug resistance protein, MDR)은 약물 이동에 중요한 역할을 하는 약물 수송체 중의 하나이다. 이는 항암 치료에 있어서의 다중약물 내성과 관련되어 처음 발견되었다. 즉 MDR에 의해 수송되는 항암제를 계속 투여하면 암 세포 내의 MDR 단백질의 양이 증가하여 초기에는 항암제에 반응을 하던 암 세포가 내성을 갖게 된다. MDR은 암 세포뿐만 아니라 간, 소장, 콩팥, 뇌 등의 정상 세포에도 존재하면서 다양한 종류의 비극성 물질 혹은 유기 양이온계 물질

의 수송을 담당하고 있다.^{2, 3}

다중약물 저항성 관련 단백(multidrug resistance associated protein, MRP) 역시 약물 이동에 중요한 역할을 하는 수송체로, 사람에게 있어서 현재까지 9개의 아형이 밝혀졌으며 이 중 MRP2, MRP3에 대한 연구가 가장 많이 진행되었다.⁴

MRP2는 체내 담즙관의 상피 세포에 주로 분포되어 있으면서 담즙산의 장-간(entero-hepatic) 순환뿐 아니라 포합 또는 불포합 형태의 여러 가지 약물의 담즙관으로의 배출 역할을 한다.^{5, 6, 7} 포합 담즙산의 체내 축적을 특징으로 하는 유전 질환 중의 하나인 Dubin-Johnson 증후군의 발병은 MRP2의 유전자 변이와 밀접하게 관련이 있는 것으로 알려졌다.⁸ 예를 들어 MRP2 exon30의 1392부터 1394번째까지의 염기가 결실된 변이를 갖는 Dubin-Johnson 증후군 환자의 간에서는 MRP2의 단백질이 발현되지 않는 것으로 알려졌다. 왜냐하면 이 변이를 가질 경우 소포체 내의 chaperon이 MRP2에 결합하여 MRP2가 Golgi로 이동하지 못하고 소포체 내에서 붕괴되기 때문이다.⁹ MRP2는 정상 조직뿐 아니라 난소암, 대장암, 백혈병, 간암 등에서 발현되면서 etoposide, vincristine, cisplatin, doxorubicin 등의 여러 가지 항암제에 대한 내성에 관여하는 것으로 알려졌다.^{7, 10, 11, 12}

MRP3의 경우 간, 콩팥 등에 분포되어 있으면서 다양한 유기 음이온계 물질을 수송한다. MRP3은 MRP2와는 달리 정상 시에는 간에서의 발현량이 적으나, 담즙정체성 간 질환과 같이 MRP2가 손상된 경우에는 단백질 발현이 증가하여 MRP2와 비슷하게 담즙산의 장-간 순환에 관여한다.^{13, 14, 15}

MDR이나 MRP의 약물 수송 능력에 영향을 주는 유전자 변이를 갖는 개체의 경우 약물의 역동이 달라져 그 약물에 대한 반응이 다른 개체와 다르게 나타날 수 있으며 그 대표적인 예로 MDR1의 3435C/T 변이를 들 수 있다. MDR1에 의하여 체내에서 수송되는 약물인 digoxin을 동일한 용량으로 투여 시 TT 유전자형을 갖는 개체는 CC 유전형

을 갖는 개체보다 digoxin의 혈중 농도가 높아지게 된다. 이는 TT 유전자형을 갖는 개체에서 CC 유전자형을 갖는 개체에 비해 MDR1 단백질 발현이 감소되어 있기 때문이다. Digoxin의 경우 치료 지수가 매우 적은 약물이기 때문에 이와 같은 혈중 농도의 변화는 환자에게 매우 치명적인 독작용을 초래할 수 있다.^{16, 17, 18}

본 연구에서는 한국인에서 약물 수송체 중 중요한 역할을 할 것으로 기대되는 MDR1, MRP2, MRP3의 유전자 변이를 검색하고 각 변이의 기능을 측정하였다. 또한 이들 약물 수송체는 간에서의 약물 수송과도 관련이 있으므로 독성 간염 환자에서의 유전자 변이 및 일배체형의 빈도를 정상인과 비교하여 독성 간염 발병과 약물 수송체 변이나 일배체형 간의 상관성 여부를 밝히고자 하였다.¹⁹

독성 간염을 일으킬 수 있는 약물은 임상에서 사용 상 제한을 받게 된다. 실제로 tienillic acid, benoxaprofen, bromfenac, tacrine, tasmar 등의 약물이 간 독성 때문에 사용이 금지되거나 제한되고 있다. 약물이 독성 간염을 일으키는 기전은 다양하다. 예를 들어 독성 간염을 일으키는 가장 흔한 약물인 acetaminophen은 정상 상태에서는 glucuronide와 sulfate에 의해 포함되어 대사되지만, 간 내의 acetaminophen 양이 많아지게 되면 포함되지 못한 약물이 P450 2E1에 의해 N-acetylbenzoquinone-imide라는 중간 산물로 대사되어 간 독성을 일으킨다.²⁰

독성 간염을 진단하기 위하여 중요하게 고려해야 할 사항은 약물 복용 시점과 증상이 나타난 시점의 시간 간격 그리고, 약물 중단 시점과 증상 소실 시점의 사이의 상관관계 여부이다. 약물에 의한 독성 간염 진단 기준은 1989년에 만들어진 Roussel Uclaf causality assessment method(RUCAM)이 주로 이용되고 있다. RUCAM은 약물 복용 후 증상이 나타나기까지의 시간, 증상의 경과, 약물 반응의 위험 인자 유무, 병용 약물 유무, 비약물적인 원인 유무, 약물에 대한 사전 정보, 재 투여 시 반응 등에 따라 점수를 산정하도록 되어 있다.²¹

MDR1, MRP2, MRP3 유전자 변이를 바탕으로 각각의 일배체형을 구

성한 결과 MRP2 유전자의 일배체형이 정상인과 독성 간염 환자 간에 통계적으로 유의한 빈도 차이를 보였다. 이러한 차이는 일배체형을 구성하는 변이 중 promoter 부위에 있는 변이에 의한 것으로 추측되어 이것이 MRP2 유전자 발현에 미치는 영향에 대하여 알아보았다.

MRP2 단백질 발현은 개체에 따라 그 정도가 약 15배 정도까지 차이를 보일 수 있다.²² 단백질 발현은 endocytic retrieval, exocytic insertion에 의한 세포막으로의 sorting 시의 조절, 전이 시의 조절, 전사 시의 조절 등에 의하여 달라질 수 있으며 본 연구에서는 이 중 전사 시의 조절에 초점을 두었다.⁷

MRP2 단백질 발현을 위해서는 특정 promoter/enhancer 부위가 필요하다. 현재까지는 전이 시작점으로부터 뒤로 197(-197)부터 517(-517)까지의 염기 부위가 MRP2 단백질 발현을 유지하는 데에 필요한 것으로 알려졌다.¹⁵ 특히 -441과 -436 사이에 TATA box가 중요한 역할을 하는데, 그 이유는 여기에 TATA binding protein(TBP)과 같은 전사 전 개시 복합체가 결합하기 때문이다. 흰쥐의 MRP2 단백질 발현에 중요하다고 알려진 Y box나 GC box는 사람엔 없는 것으로 알려졌다.¹⁵ 또한 전이 시작점으로부터 뒤로 81로부터 248까지의 염기 부위도 MRP2 단백질 발현에 중요하며 여기에는 hepatocyte nuclear factor 1(HNF1), upstream stimulatory factor(USF)-like element 등이 결합하는 것으로 알려졌다.^{23, 24}

현재까지의 MRP2 유전자의 전사 조절에 대한 연구 중 가장 잘 알려진 것은 핵 내 수용체인 farnesoid X-activated receptor(FXR), pregnane X receptor(PXR), constitutive androstane receptor(CAR)에 의한 전사 조절이다. 즉, 이들 수용체의 결합 물질인 chenodeoxycholic acid, dexamethasone, phenobarbital 등이 각각 FXR, PXR, CAR 수용체에 결합하면 이들 수용체가 역시 핵 내 수용체인 retinoid X receptor(RXR)와 이종체(heterodimer)를 이루어 MRP2 mRNA 증가를 유도한다. 이와는 달리 패혈증, 알코올, 자가 면역, 바이러스성 간염, 담

증정체성 간 질환 등과 같이 간에 염증 반응이 유발되는 경우에는 tumor necrotic factor- α , interleukin-6, interleukin-1 β 등의 급성 반응 때의 염증 매개 물질이 MRP2 mRNA 발현을 감소시킨다.⁷

본 연구에서는 체내의 약물 역동에 중요한 역할을 한다고 알려진 약물 수송체 중 MDR1, MRP2, MRP3의 유전자 변이를 찾고자 하였으며 이들 변이 유전자의 기능 검색을 통하여 독성 간염 발병과 이들 유전자 변이와의 상관성 여부를 알아보고자 하였다.

II. 대상 및 방법

1. 대상 및 시료

본 연구는 110명의 정상인과 94명의 독성 간염 환자를 대상으로 하였다. 독성 간염 환자는 RUCAM에 근거하여 진단하였으며, 혈액 시료 채취 전 본 연구에 대한 설명 후 서면 동의서를 받았다. 혈액 샘플에서 DNA는 DNA blood mini kit(Qiagen GmbH, Hilden, Germany)을 이용하여 추출하였다. RUCAM은 각 환자를 약물 복용 후 증상이 나타나기까지의 시간, 증상의 경과, 약물 반응의 위험 인자 유무, 병용 약물 유무, 비약물적인 원인 유무, 약물에 대한 사전 정보, 재 투여 시 반응 등에 따라 -7부터 14까지의 점수로 분류하도록 되어 있다. 이 점수는 약물에 의한 독성 간염의 가능성을 나타내는 지표로서, 9점 이상은 확실함을, 6-8점은 거의 확실함을 나타낸다. 또한 3-5점은 가능성이 있음을, 1-2점은 가능성이 희박함을 나타내며, 0점 이하는 진단에서 배제된다.

2. 유전자 분석

MDR1, MRP2, MRP3 유전자 변이는 two-dimensional gene scanning(TDGS) 및 denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE)를 이용하여 분석하였다. 먼저 genomic DNA를 주형으로 사용하여 MDR1, MRP2, MRP3 유전자를 증폭시키는 long 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 시행한 후, 여기서 나온 생성물을 주형으로 다시 multiplex short 중합효소 연쇄 반응을 하여 모든 exon을 증폭시켰다. 증폭 후 DNA 조각을 완전히 denaturation 시킨 후 다시 renaturation 시킴으로써 변이가 있는 대립 유전자를 포함하는 DNA의 경우에는 heteroduplex가 형성되도록 하였다. 또한 primer에 HEX라는 형광물질

을 붙여 DNA band를 분석하였다. Multiplex 중합효소 연쇄 반응을 통하여 증폭된 DNA 조각들은 urea, formamide로 이루어진 화학적 변성 증감 젤에서 전기영동을 시키면서 분자량 및 녹는점에 따라 분리되도록 하였다. 전기영동 후 젤은 형광 스캐너(Bio-rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

변이의 heterozygote와 homozygote 비율은 SNaPshot 방법(DNA link, Seoul, Korea)을 이용하여 측정하였다.

MDR1, MRP2, MRP3 유전자의 promoter 상의 유전자 변이는 전이 시작점을 기준으로 -2000 염기쌍까지를 automatic sequencer를 이용하여 분석하였다.

각 유전자의 일배체형은 expectation-maximization algorithm에 근거한 Haploview 3.2(Broad Institute of Harvard and MIT, Cambridge, MA, USA)를 이용하여 구성하였다.²⁵

3. 변이 클론 제작

pMT21-MDR1, pcDNA3.1-MRP2, pcDNA3.1-MRP3 plasmid를 각각 주형으로 Quickchange site-directed mutagenesis kit(Stratagene, La Jolla, CA, USA)를 이용하여 중합효소 연쇄 반응을 시행하였다. 여기서 얻은 생성물을 전기 천공법으로 transformation 시킨 후 Plasmid mini preparation kit(Qiagen GmbH, Hilden, Germany)을 이용하여 DNA를 추출하고 automatic sequencer로 변이 여부를 재확인하였다.

4. Immunoblotting

HEK(human embryonic kidney) 293T 세포를 10% 우태아 혈청(Gibco, Grand Island, NY, USA), 100 unit/ml penicillin G, 100 µg/ml streptomycin(Gibco, Grand Island, NY, USA)이 포함된 Dulbecco's

modified eagle medium(Gibco, Grand Island, NY, USA)에서 37℃, 5% CO₂ 하에 배양하였다. Wild type, 변이 클론은 lipofectamine-plus reagent(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 HEK293T 세포에 각각 transfection 시켰다. Transfection 한 지 24시간 후의 세포를 0.05% trypsin-EDTA(Gibco, Grand Island, NY, USA)를 이용하여 얻은 다음 찬 인산완충액(Gibco, Grand Island, NY, USA)으로 세 번 세척한 후 lysis buffer를 넣고 초음파 분쇄기에서 10초간 3회 반복하여 세포를 파괴하였다. 이 후 4℃에서 13000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상청액을 얻었고, 단백질 농도는 Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 정량하였다. 일정량의 단백을 acrylamide 겔에서 전기영동 하여 분리한 후 nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)으로 옮겼다. Membrane을 5% 탈지분유, 0.1% tween 20(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)이 함유된 인산완충액으로 상온에서 1시간 동안 차단한 후 일차 항체를 4℃에서 12시간 반응시켰다. 항 MDR1 단클론 항체는 Calbiochem(San Diego, CA, USA), 항 MRP2 단클론 항체는 Kamiya Biomedical Company(Seattle, WA, USA), 항 neomycin phosphotransferase II 다클론 항체는 Upstate(Lake Placid, NY, USA)에서 각각 구입하였고 항 MRP3 다클론 항체는 MRP3 펩티드를 토끼에 면역시켜 얻었다. 0.05% tween 20이 함유된 인산완충액을 이용하여 3회 세척한 후 이차 항체로 상온에서 1시간 반응시켰다. 이 후 0.05% tween 20이 함유된 인산완충액으로 3회 세척한 다음 ECL solution kit(Amersham bioscience, Uppsala, Sweden)를 사용하여 현상하였다.

5. MDR 및 MRP 유전자 기능 측정

Wild type, 변이 클론을 transfection한 HEK293T 세포를 0.1 mM Ca²⁺와 1 mM Mg²⁺를 함유한 인산완충액으로 두 번 세척한 후, 세포

수가 10×10^6 개/ ml 이 되도록 0.1 mM Ca^{2+} 와 1 mM Mg^{2+} 를 함유한 인산완충액으로 희석하였다. 세포를 $500 \mu\text{l}$ 씩 fluorescence activated cell sorter flow cytometer용 튜브(BD Bioscience, Bedford, MA, USA)에 분주한 다음 일정 농도의 형광 물질을 각각의 튜브에 넣었다. 형광 물질로 MDR1, MRP3 유전자의 경우에는 1 uM 의 calcein-ammonium salt(Molecular probe, Eugene, Oregon, USA)를, MRP2 유전자의 경우에는 10 uM 의 5-6-carboxyfluorescein-diacetate(Molecular probe, Eugene, Oregon, USA)를 사용하였다. 이상의 모든 과정은 얼음 위에서 진행하였다. 37°C 수조에 세포를 함유한 튜브를 30분간 유지 시켜 세포가 형광 물질을 배출하도록 한 후 FACS flow cytometer(BD Bioscience, Bedford, MA, USA)를 이용하여 1×10^4 개의 세포 내에 남아있는 형광 물질 양을 측정하였다.

6. 역전사 중합효소 연쇄 반응

MRP2 유전자의 334-49C/T (intron3) 염기가 각각 CC, CT, TT인 혈액으로부터 RNA를 추출하였으며 이 RNA를 주형으로 Superscript II RNase H-reverse transcriptase(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 역전사 반응을 수행하였다. 여기서 얻은 cDNA를 주형으로 forward primer: $5'\text{-CGTGTATAAATCCAGGACCAAGAGA-3'}$, reverse primer: $5'\text{-GGAGATGAAGAACAGGCAGGAGTAG-3'}$ 을 이용하여 MRP2 exon4에 대한 중합효소 연쇄 반응을 실시하였다.

7. MRP2 promoter plasmid 제작

MRP2 promoter 부위에서 찾은 특정 변이를 갖는 genomic DNA와 wild type을 갖는 genomic DNA를 각각 주형으로 forward primer: $5'\text{-AGATTCATGACTTCCTGGCTCCTT-3'}$, reverse primer: $5'\text{-AC}$

AACAATTCTCCTTCCTCACACG-3'을 이용하여 중합효소 연쇄 반응을 시행하여 2662 염기쌍의 promoter 부위 DNA를 얻었다. 이를 다시 주형으로, 5'-Kpn I, 3'-Nhe I 으로 잘리는 염기 서열을 포함하는 primer인 5'-CGGGGTACCTTGATGAACATTTAGATTCT-3', 5'-CTAGCTAGCGATTTCCTGGACTGCGTCTGG-3'을 이용하여 중합효소 연쇄 반응을 시행하였다. 이 후 생성물을 Kpn I, Nhe I (NEB, Ipswich, MA, USA)으로 자른 후 이를 pGL3-enhancer vector에 넣었다. Autonomic sequencer로 DNA sequence를 재확인하였다.

8. Luciferase 활성 측정

Luciferase reporter 유전자 활성도는 Dual luciferase reporter assay system(Promega Corporation, Madison, WI, USA)을 이용하여 측정하였다. 세포는 10% 우태아 혈청, 100 unit/ml penicillin G, 100 µg/ml streptomycin이 포함된 Dulbecco's modified eagle medium에서 37°C, 5% CO₂ 하에 배양한 HepG2 세포를 이용하였다. luciferase 활성은 HepG2 세포에 wild type, 변이 클론을 lipofectamine-plus reagent를 이용하여 각각 transfection한 후 24시간 후에 측정하였고, 이때에는 luminometer(Berthold Technologies, Wildbad, Germany)를 이용하였다. 간 독성 약물이 MRP2 promoter의 활성도에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험에서는 HepG2 세포에 wild type, 변이 클론을 각각 transfection 시킨 후 24시간 후에 200 uM의 chenodeoxycholic acid(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 세포에 처리하였다. 이 후 24시간 후에 luciferase 활성도를 측정하였다.

9. 젤 지연 분석법 (electrophoretic mobility shift assay)

핵 단백질은 HepG2 세포에서 추출하였고, MRP2 유전자의 promoter 부위 변이에 대한 primer는 -1774 G (GCACTTATCTTGTTGTTTTT), HNF3 consensus (GCCCATTGTTTGTTTAAAGCC), Evi-1 consensus (TGAGTATTCTCTTGTAATTTTCC)와 같이 제작하였다. 이들 primer에 T4 polynucleotide kinase(Promega, Madison, WI, USA)와 [γ -³²P]ATP(NEN, Boston, MA, USA)을 이용하여 표지하였다. 이 후 각각의 antisense에 해당하는 primer를 넣은 후 95°C에서 5분간 annealing 시켰다. 표지된 소식자(5×10^4 cpm)를 10 μ l의 결합 완충액에 넣은 후 핵 단백질(10 μ g)과 상온에서 30분간 반응시켰다. 미리 200V에서 2시간 동안 전기영동을 시킨 non-denaturing 4% polyacrylamide 겔에 반응물을 부하시켰다. 전기영동은 200V에서 1시간 40분 동안 시행하였고 이 후 겔을 건조시킨 다음 자가 방사법으로 기록하였다. Competition assay에서는 표지하지 않은 소식자를 표지 소식자보다 100배 많이 넣은 후 반응시켰다.

Ⅲ. 결과

1. 독성 간염 환자의 임상적 특성

독성 간염 환자 94명 중 61%가 ‘간세포형’ 독성 간염 형태를 보였으며 ‘간세포형’과 ‘담즙정체형/혼합형’ 독성 간염 환자 모두 50대의 연령층이 가장 많았다(표1). ‘간세포형’ 독성 간염 환자는 여자가 66%를 차지한 반면 ‘담즙정체형/혼합형’ 독성 간염 환자는 남녀 비율이 비슷하였다(표1). 독성 간염 환자 중 한약 및 한약재가 원인이었던 예는 ‘간세포형’이 33명(58%), ‘담즙정체형/혼합형’이 16명(43%)이었다. 원인 약물이 건강보조식품이었던 예는 ‘간세포형’이 17명(30%), ‘담즙정체형/혼합형’이 15명(41%)이었다. RUCAM가 6점 이상인 경우가 ‘간세포형’에서는 46명(81%), ‘담즙정체형/혼합형’에서는 29명(78%)로 대부분 독성 간염의 발병이 약물로 인한 것임이 확실하였다(표1, 표3).

표1. 독성 간염 환자의 간 손상 형태, 성별 및 연령에 따른 분포

연령	‘간세포형 ^{a)} ’ 환자		‘담즙정체형 ^{b)} /혼합형 ^{c)} ’ 환자	
	남	여	남	여
20-29	1	1	3	1
30-39	5	5	0	5
40-49	5	7	4	3
50-59	2	16	7	7
60-69	5	8	3	1
70-79	0	1	2	1
80-89	1	0	0	0
소계	19	38	19	18
합계	57		37	

^a alanine aminotransferase 수치가 정상 상한치보다 2배 이상 증가하거나 ‘R’^{d)} 수치가 5 이상인 경우

^b alkaline phosphatase 수치가 정상 상한치보다 2배 이상 증가하거나 ‘R’ 수치가 2 이하인 경우

^c alanine aminotransferase 수치가 정상 상한치보다 2배 이상 증가하고 ‘R’ 수치가 2-5 사이인 경우

^d 혈청 alanine aminotransferase와 혈청 alkaline phosphatase 수치의 비

표2. 원인 약물에 따른 독성 간염 환자의 분포

원인 약물	‘간세포형’ 환자	‘담즙정체형/혼합형’ 환자
한약 및 한약제 ^a	33 (58%)	16 (43%)
건강보조식품 ^b	17 (30%)	15 (41%)
양약 ^c	7 (12%)	6 (16%)
합계	57	37

^a 한약은 한의사에 의해 처방된 약물을, 한약제는 환자의 자가 처방에 의한 약물을 의미한다.

^b 인진쑥, 버섯, 노루참, 글루코사민, 클로렐라 등

^c 결핵치료제(4), 진균치료제(1), 위염치료제(1), 고지혈증치료제(1), 아세트아미노펜(1), 항히스타민제(1), 기타 항생제(4) 등 (괄호 안의 숫자는 환자 수를 나타냄)

표3. RUCAM 점수에 따른 독성 간염 환자의 분포

RUCAM 점수	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
‘간세포형’ 환자	1	3	7	7	13	17	5	2	1	1
‘담즙정체형/혼합형’ 환자	0	1	7	6	10	8	2	1	1	1
합계	1	4	14	13	23	25	7	3	2	2

RUCAM 점수 ≥ 9 : 원인이 확실함

6-8: 원인이 거의 확실함

3-5: 원인일 가능성이 높음

1-2: 원인일 가능성이 낮음

≤ 0 : 원인일 가능성이 없음

2. 한국인에서의 MDR1, MRP2 및 MRP3 유전자 변이

정상인과 독성 간염 환자의 MDR1, MRP2, MRP3 유전자 변이를 검색한 바(그림1), MDR1와 MRP3 유전자의 경우에는 각각 14개와 16개의 변이를 찾았다. 그러나 이들 유전자 변이 중 정상인과 환자 간에 통계적으로 유의한 빈도 차이를 보이는 것은 없었다(표4, 표5). MRP2 유전자의 경우 promoter 부위를 포함하여 총 12개의 변이를 확인하였다(표6). 이들을 일배체형으로 구성하였을 때 2개의 일배체형이 정상인과 환자 간에 통계적으로 유의한 빈도 차이를 보였다. 즉 정상인과 ‘간세포형’ 독성 간염 환자 사이에서는 3번 일배체형이, 정상인과 ‘담즙정체형/혼합형’ 독성 간염 환자 사이에서는 1번 일배체형이 통계적으로 유의한 빈도 차이를 보였다(표7).

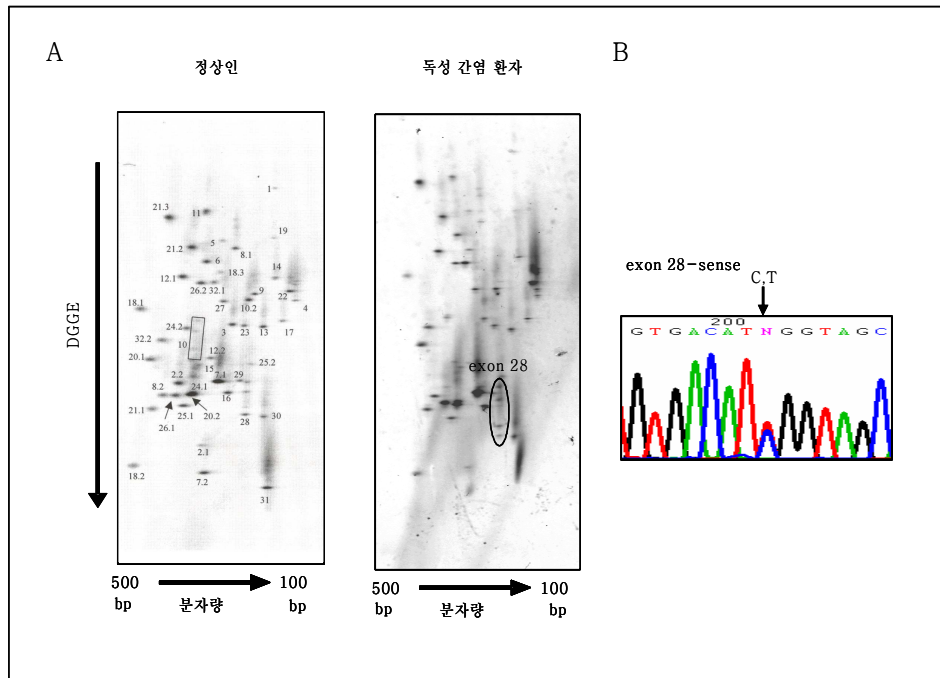


그림1. TDGS 분석법을 이용한 MRP2 유전자 변이. (A) 다단계 중합효소 연쇄 반응 결과 증폭된 46개의 MRP2 조각이 젤에 분자량과 녹는점에 따라 분포되었다. 변이가 있는 경우 heteroduplex를 형성하기 때문에 1개의 점으로 나타나지 않고 위와 같이 3-4개의 점으로 나타난다. (B) TDGS, DGGE 법으로 찾은 변이를 automatic sequencer로 재확인한 결과이다.

표4. MDR1의 유전자 변이

변이	변이
-8669T/C	1000-44G/A (intron9)
-8534C/T	1236C/T
-2353G/A	1554+24C/T (intron13)
-935A/G	1725+38G/A (intron14)
-709C/A,T	A893S/T
-693T/C	3435C/T
N21D	V125I

표5. MRP3의 유전자 변이

변이	변이
-2137A/G	A565T
-1767G/A	2526C/T
-1306C/T	2600-123C/T (intron19)
-1213C/G	2714+29C/T (intron20)
-1134C/T	3039C/T
-890C/del	3579-66C/T (intron24)
349-53G/A (intron3)	3972C/T
613-22G/A (intron5)	4509A/G

표6. MRP2의 유전자 변이

변이	정상인		‘간세포형’ 환자		‘담즙정체형/혼합형’ 환자	
		(명)	(명)	<i>P</i> 값	(명)	<i>P</i> 값
-1774G/del	+/+	50	30	0.28	9	0.04*
	+/-	46	23		20	
	-/-	14	4		8	
-1549G/A	+/+	66	30	0.03*	24	0.11
	+/-	42	22		10	
	-/-	2	5		3	
-24C/T	+/+	74	31	0.06	25	0.75
	+/-	34	22		11	
	-/-	2	4		1	
-23G/A	+/+	105	55	0.06	37	0.20
	+/-	5	2		0	
334-49C/T (intron3)	+/+	66	28	0.06	23	0.20
	+/-	41	24		11	
	-/-	3	5		3	
V417I(exon10)	+/+	92	47	0.22	34	0.29
	+/-	15	10		3	
	-/-	3	0		0	
T486I(exon10)	+/+	107	56	0.52	36	0.35
	+/-	3	1		1	
2620+3A/G (intron19)	+/+	110	56	0.52	37	0.35
	+/-	0	1		0	
2934G/A (exon22, S978)	+/+	100	52	0.02*	35	0.12
	+/-	9	5		2	
	-/-	1	0		0	
3972C/T (exon28, I1324)	+/+	61	29	0.02*	23	0.12
	+/-	47	22		11	
	-/-	2	6		3	
4147-35G/A (intron29)	+/+	107	52	0.52	37	0.35
	+/-	3	5		0	
4508+12G/A (intron31)	+/+	108	57	0.52	37	0.35
	+/-	2	0		0	

P 값은(+/+ vs -/-) 정상인과 비교하였을 때의 값이며, 카이-제곱 분석법을 이용하여 구하였다. **P*<0.05

표7. MRP2 유전자의 주요 일배체형

													그룹		
													정상인	'간세포형' 환자	'담즙정체형/혼합형' 환자
4508+12G/A	4147-35G/A	3972C/T	2934G/A	2620+3A/G	T 4861	V 4171	334-49C/T	- 23G/A	- 24C/T	-1549G/A	-1774G/del				
1	del	G	C	G	C	V	T	A	G	C	G	G	72 (32.7)	30 (26.3)	36 (48.6) ^a
2	G	G	C	G	C	V	T	A	G	C	G	G	51 (23.1)	30 (26.3)	15 (20.8)
3	G	A	T	G	T	V	T	A	G	T	G	G	31 (14.1)	28 (24.6) ^b	13 (17.5)
4	G	G	C	G	C	I	T	A	G	C	G	G	19 (8.6)	5 (4.4)	3 (4.1)
5	G	G	C	G	C	V	T	A	A	C	G	G	11 (5.0)	4 (3.5)	2 (2.7)
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
												합계	220	114	74

밑줄 친 굵은 글씨는 변이를 나타낸다. 정상인에서의 빈도가 5% 이상의 일배체형을 빈도가 높은 순으로 나타내었다. 정상인과 환자군 간의 빈도 차이의 유의성 여부는 카이-제곱 분석법을 이용하여 결정하였다.

^a $P=0.013$, ^b $P=0.017$

3. MDR1, MRP2 및 MRP3 변이 유전자의 기능

MDR1, MRP2, MRP3 변이 유전자의 기능을 세포 수준에서 알아보기 위하여 FACS flow cytometer를 이용하여 형광 물질 수송 능력을 측정하였다. 그 결과 본 연구에서 찾은 MDR1, MRP2, MRP3 변이 유전자의 기능은 wild type에 비하여 큰 차이를 보이지 않았다. 단 MRP2 변이 유전자 중 Dubin-Johnson 증후군의 발병과 관련이 있다고 알려진 R768W 변이의 경우 그 기능이 80% 정도 감소하였으나 이 변이는 본 연구 대상 중에는 없었다(그림2).

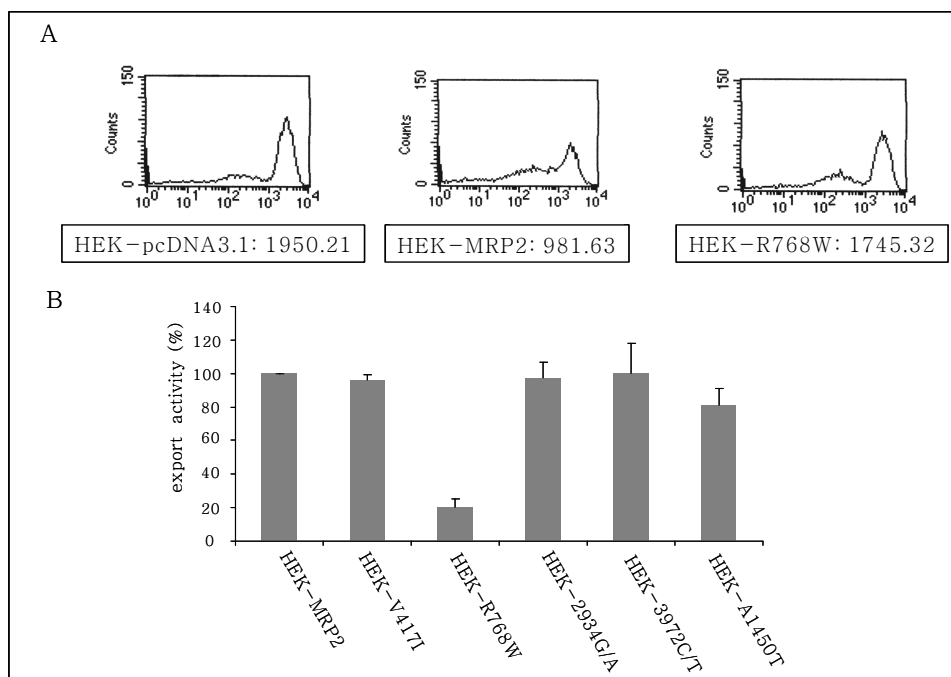


그림2. MRP2 변이 유전자의 기능. (A) 네모 안의 숫자는 10×10^4 개의 세포가 형광 물질을 배출한 뒤, 세포 내에 남은 형광 물질의 상대적인 양을 나타내며, (B) MRP2 유전자의 배출 기능을 100%로 보았을 때 변이 유전자의 기능을 상대적으로 표시한 그래프이다.

4. MRP2 변이 유전자의 단백 발현

MRP2 유전자 변이가 MRP2 단백 발현에 영향을 미치는 지 알아보기 위하여 immunoblotting을 시행하였다. 그 결과 한국인에서 발견된 MRP2 변이는 wild type에 비하여 단백 발현량이 의미 있게 차이가 나지 않았고, Dubin-Johnson 증후군의 발병과 관련 있다고 알려진 R768W 변이는 단백 발현량이 현저하게 감소하였다(그림3A).

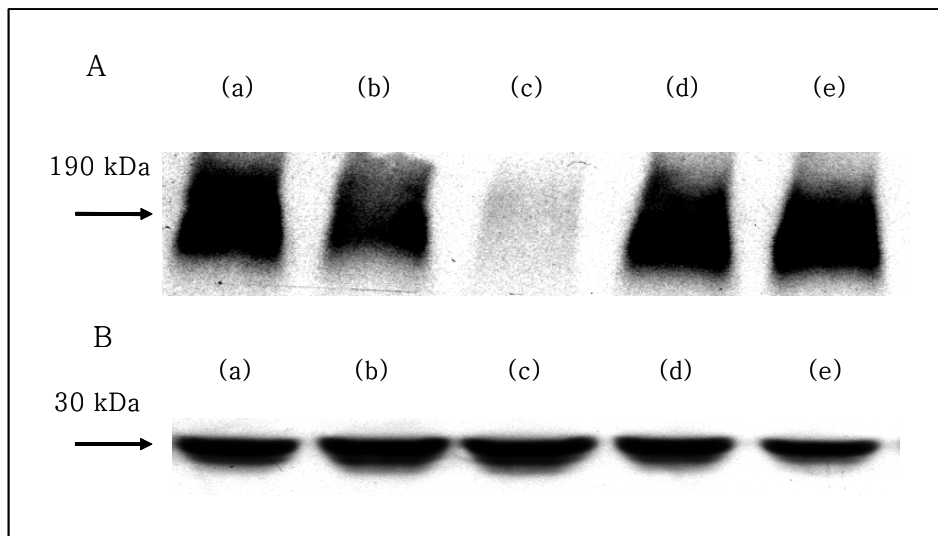


그림3. MRP2 변이 유전자의 MRP2 단백 발현. (A)은 MRP2 발현 정도를 본 것이고, (B)는 transfection 정도를 보정하기 위하여 neomycin phosphotransferase II의 발현 정도를 본 것이다. (a)는 MRP2 wild type, (b)는 V417I 변이, (c)는 R768W 변이, (d)는 2934G/A 변이, (e)는 3972C/T 변이의 단백 발현량을 나타낸 것이다.

5. MRP2 유전자 변이가 splicing에 미치는 영향

‘간세포형’ 독성 간염 환자에서 통계적으로 유의한 빈도 차이를 보인 3번 일배체형을 구성하는 변이 중 334-49C/T (intron3) 변이가 splicing에 영향을 주는 지 알아보기 위하여 역전사 반응을 수행하였다. 즉 각각 2개씩의 wild, hetero, mutant type의 cDNA를 합성한 후 이를 주형으로 exon4에 대한 중합효소 연쇄 반응을 수행하였다. 그 결과 모든 경우에 중합효소 연쇄 반응의 산물이 364 bp로, exon4가 skipping이 되는 경우는 없었다. 단 mutant 중 1개의 경우 wild type과 비교하였을 때 중합효소 연쇄 반응 산물의 양이 약간 감소하였다(그림4A).

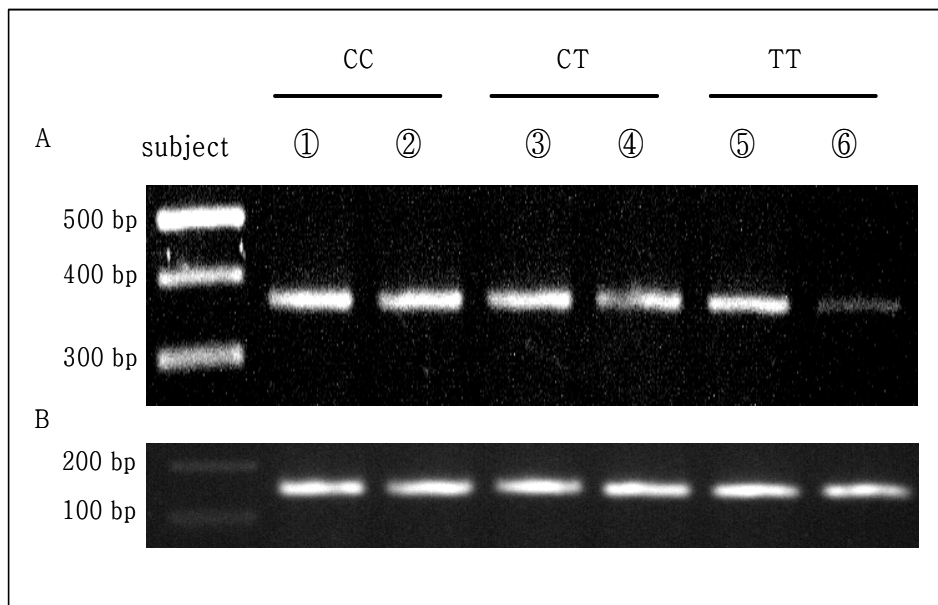


그림4. MRP2 유전자의 exon4에 대한 중합효소 연쇄 반응. (A)은 exon4, (B)는 β -actin에 대한 중합효소 연쇄 반응 산물이다.

6. MRP2 변이 유전자의 luciferase 활성

본 연구에서 찾은 MRP2 유전자의 promoter 부위 변이를 이용하여 일배체형을 구성한 후 이의 기능을 dual luciferase reporter assay system을 이용하여 측정하였다. 그 결과 wild type 일배체형과 비교했을 때 (-)GCG 일배체형은 35.7%, GATG 일배체형은 39.2% 그 활성이 감소된 반면 GACG 일배체형은 큰 차이를 보이지 않았다(그림5).

담즙정체형 간 독성의 원인이 되는 chenodeoxycholic acid 약물을 처리한 후 MRP2 유전자의 promoter 활성도를 보면, 약물을 처리하기 전에 비해 그 활성이 wild type 일배체형의 경우 60.9% 증가한 반면 (-)GCG 일배체형은 28.6% 증가하였다. GATG 일배체형은 약물 처리 전보다 활성이 78.4% 증가하였다(그림6).

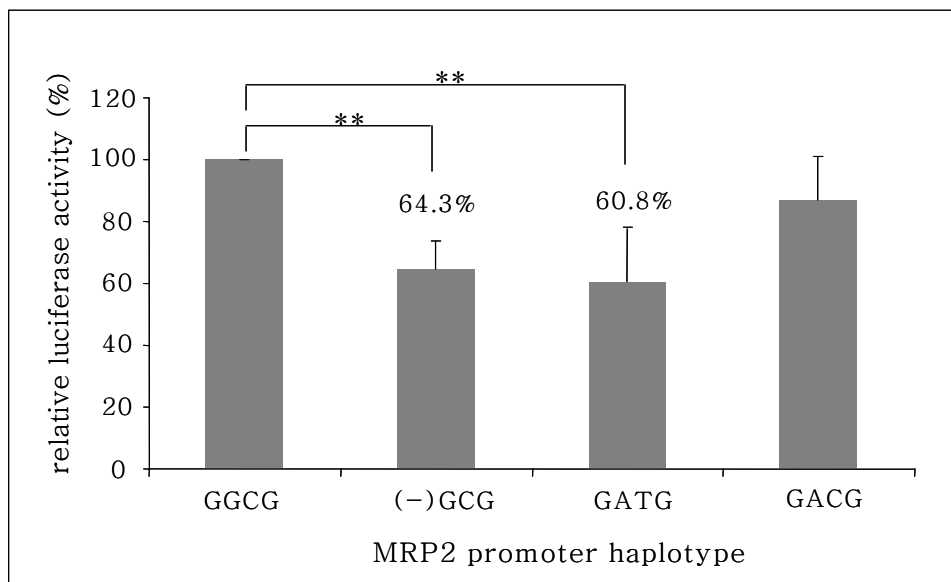


그림5. MRP2 유전자의 promoter 변이 일배체형의 luciferase 활성. wild type인 GGCG 일배체형의 luciferase 활성 정도를 100%로 보았을 때 나머지 일배체형의 활성 정도를 상대적으로 나타내었다. ** $P < 0.01$

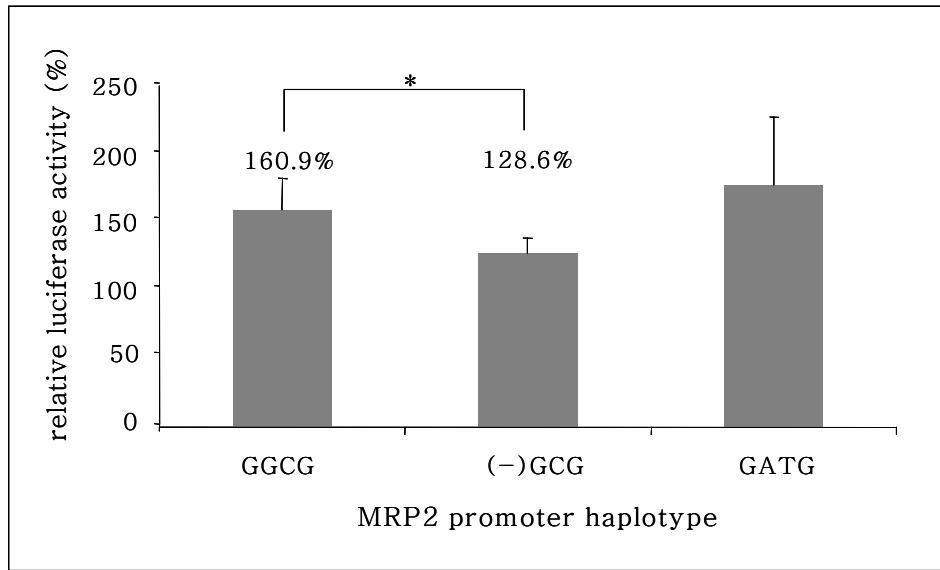


그림6. 간 독성을 일으키는 약물에 의한 MRP2 유전자의 promoter 변이 일배체형의 luciferase 활성 변화. 200 uM의 chenodeoxycholic acid를 처리하기 전의 각 일배체형의 luciferase 활성 정도를 100%로 보았을 때 약물 처리 후의 활성 정도를 %로 나타내었다. * $P<0.05$

7. MRP2 유전자의 promoter 변이 부위에 결합하는 전사조절 인자

MRP2 유전자의 promoter 부위 변이 중에서 정상인과 독성 간염 환자 간에 통계적으로 유의한 빈도 차이를 보인 일배체형 중 (-)GCG 일배체형에 영향을 주는 전사조절 인자를 알아보기 위해 젤 지연 분석법을 이용하였다. 그 결과 -1774G/del 부위에는 HNF3 전사조절 인자가 결합함을 알 수 있었다. 또한 이 변이 부위에는 Evi-1 전사조절 인자도 결합하지만 이는 HNF3보다는 훨씬 약하게 결합하는 것을 알 수 있었다(그림7).

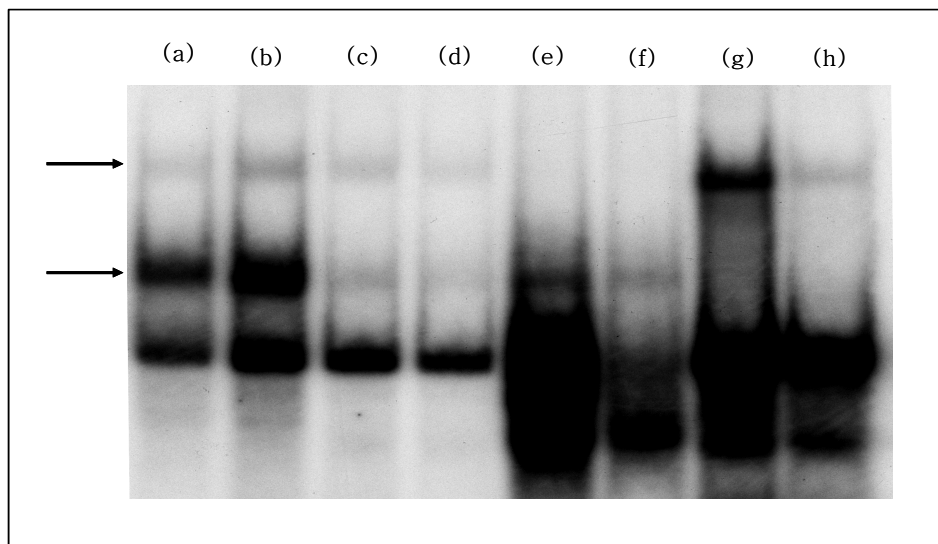


그림7. MRP2 유전자 promoter 부위 -1774, G/del 변이 부위에 결합하는 전사조절 인자. (a), (b)는 -1774, G 소식자와 핵 단백 간의 결합, (c), (d)는 -1774, G 소식자에 대한 competition assay, (e)는 HNF3 consensus 소식자와 핵 단백 간의 결합, (f)은 HNF3 consensus 소식자에 대한 competition assay, (g)는 Evi-1 consensus 소식자와 핵 단백 간의 결합, (h)은 Evi-1 consensus 소식자에 대한 competition assay 결과이다.

IV. 고찰

약물 수송체는 10개 이상이 알려져 있으나 그 중 MDR1, MRP2, MRP3가 체내 약물 동태에 중요한 역할을 한다고 알려졌다. 이들 수송체는 간에서 발현되며 MDR1, MRP2는 담즙관으로의 약물 및 담즙산 배출, MRP3은 혈액으로의 약물 배출 역할을 한다.¹⁹ 따라서 이들 수송체의 기능이 떨어지는 경우 약물에 의한 간 손상이 정상일 때보다 쉽게 발생할 수 있을 것이라고 생각되었다. 실제로 MRP2의 유전자 변이 중 10여개가 포함 담즙산이 축적되는 Dubin-Johnson 증후군과 관련 있음이 이미 밝혀졌다.²⁶

본 연구에서 찾은 MPR2 유전자 변이를 이용하여 구성된 일배체형 중 2개의 일배체형이 정상인과 독성 간염 환자 간에 유의한 빈도 차이를 보였다. 이 일배체형을 구성하는 변이 중 MPR2 유전자 exon 부위 변이의 기능을 측정해 보았으나 이는 MRP2의 배출 능력에 큰 영향을 주지 않았다. 현재까지 알려진 MRP2 유전자 변이는 60여개가 있으나 이 중 변이의 기능 변동 여부가 밝혀진 것은 거의 없으며, I1173F, R1150H와 같은 몇몇 변이만이 기능이 감소한다고 알려졌다.²⁷

일배체형을 구성하는 intron 부위의 변이 역시 splicing에 영향을 주지 않는 것으로 확인되어 promoter 부위의 변이가 중요할 것으로 예측되었다.

MRP2 단백 발현은 여러 인자에 의해 조절된다. 지금까지의 연구에 의하면 chenodeoxycholic acid, cholic acid, ursodeoxycholic acid, glucocorticoid, endothelin-1, interleukin-1 β , tumor necrosis factor α , interleukin-6 등과 같은 내인성 인자와 arsenic, cisplatin, rifampicin, spironolactone, nifedipine, oltipraz, sulforaphane, phenobarbital, tamoxifen, genipin 등의 외인성 인자가 MRP2 단백 발현 조절에 관여한다고 알려졌다.²⁸

본 연구 결과에서 정상인과 비교했을 때 ‘담즙정체형/혼합형’ 독성 간

염 환자에서 유의한 빈도 차이를 보인 (-)GCG 일배체형과 ‘간세포형’ 독성 간염 환자에서 유의한 빈도 차이를 보인 GATG 일배체형은 wild type 일배체형에 비해 promoter 활성이 감소되었다. 특히 (-)GCG 일배체형은 chenodeoxycholic acid를 처리했을 때의 promoter 활성 증가 정도도 wild type 일배체형에 비해 적게 나왔다.

Chenodeoxycholic acid는 cholesterol의 간 내 분해 산물 중의 하나로, 장에서 lithocholic acid로 전환된 후 다시 간으로 재흡수 되는 데 이것이 과다한 경우에는 담즙정체형 간 독성이 일어날 수 있다.²⁹ Chenodeoxycholic acid가 MRP2 단백 발현을 증가시킨다는 것은 이미 선행된 다른 연구에서 밝혀졌다. Chenodeoxycholic acid와의 결합을 통해 FXR가 활성화되면 FXR이 RXR α 와 이종체를 형성한 후 MRP2의 promoter 부위에 결합하여 MRP2의 발현을 증가시킨다는 것이 지금까지 알려진 기전이다. 이 때 FXR/RXR α 이종체가 결합하는 MRP2의 부위는 환취의 경우 이미 선행 연구에서 밝혀졌다. 즉 전사 시작점으로부터 440 염기쌍 앞부분에 위치한 곳으로, 8개의 염기쌍을 사이로 AGTTCA가 거꾸로 반복되어 있어 ER-8(everted repeat with 8-bp spacer)라고 명명된 부위이다.^{29, 30} 다른 연구 결과에 의하면 cholic acid나 ursodeoxycholic acid와 같은 담즙산은 FXR의 활성과 무관하게 MRP2의 단백 발현을 증가시킨다고 알려졌다.^{31, 32} 또한, taurine-conjugated ursodeoxycholic acid도 FXR의 활성과는 무관하게 protein kinase C 의존적 기전에 의해 담즙관 내막으로의 MRP2의 삽입을 증가시키는 것으로 알려졌다.³³

본 연구에서는 -1774G/del 변이 부위에 결합할 수 있는 전사조절 인자를 MatInspector라는 프로그램을 이용하여 예측해 보았다. 그 결과 HNF3라는 전사조절 인자가 결합할 것이라고 예측하였고, 실제로 이 인자가 변이 부위에 결합한다는 것을 젤 지연 분석법을 통하여 확인하였다. HNF3은 α 1-antitrypsin과 transthyretin 유전자의 promoter에 결합하는 전사조절 인자로 처음 알려졌으며 간, 췌장, 소장, 폐 등에 발현

되어 있는 100개 이상의 유전자가 HNF3에 대한 결합 부위를 갖고 있다. HNF3은 α , β , γ 와 같이 세 종류로 되어 있는 데 이 중 HNF3 β , HNF3 γ 가 전사 활성화에 중요한 역할을 한다. HNF3은 간, 췌장, 소장의 분화와 체내 대사 조절 등에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다.³⁴ 흰쥐의 배아 줄기 세포를 이용하여 수행한 연구 결과에 의하면 HNF3이 배아 줄기 세포의 간세포로의 분화 및 간세포에서의 organic anion transporting peptide 1(oatp1), mrp1, mrp2, mrp3, bilirubin uridine glucuronosyltransferase(ugt1a1)의 발현에 반드시 필요하다는 것이 밝혀졌다.³⁵ 몇몇 선행 연구에 의하면 HNF3은 duck hepatitis B virus major surface antigen promoter, fibrinogen β promoter 등의 활성화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다.^{36, 37} HNF3이 흰쥐의 α -fetoprotein promoter의 활성을 억제한다는 연구 결과도 있어 HNF3이 유전자의 종류에 따라 향상 또는 억제 작용 둘 다 할 수 있음을 알 수 있다.³⁸ 하지만 아직까지 MRP2의 전사에 있어서 HNF3의 역할에 관해서는 알려진 바가 없다.

본 연구에서는 약물로 인한 간 독성에 취약성을 줄 수 있는 MRP2의 유전자 변이를 밝혀냈다. 즉 GATG 일배체형은 wild type 일배체형에 비해 promoter 활성이 감소하기 때문에, 그리고 (-)GCG 일배체형은 wild type 일배체형에 비해 promoter 활성이 떨어질 뿐 아니라 담즙산에 의한 promoter 활성 증가도 wild type 일배체형에 비해 감소하기 때문에 이들 일배체형을 갖는 경우 약물이나 담즙산의 담즙관으로의 배출이 정상보다 감소할 것이다.

본 연구 결과 MRP2 유전자는 독성 간염과 관련성이 높으며 특히 변이에 따른 promoter의 활성 감소가 발병에 중요한 결정 인자임을 알 수 있었다.

V. 결론

본 연구에서는 약물 수송체의 유전자 변이와 독성 간염 발병 간의 상관성 여부를 밝히기 위해 110명의 정상인과 94명의 독성 간염 환자에서 MDR1, MRP2, MRP3의 유전자 변이를 분석하였다. 각 유전자 변이의 통계적 분석과 기능 측정을 통해 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 독성 간염 환자의 61%가 ‘간세포형’ 독성 간염 형태를 보였으며 대부분 한약 및 한약재나 건강보조식품에 기인한 것이었다. ‘간세포형’과 ‘담즙정체형/혼합형’ 독성 간염 환자 모두 50대에서 가장 많았다. ‘간세포형’ 독성 간염 환자는 여자가 많은 반면 ‘담즙정체형/혼합형’ 독성 간염 환자는 남녀 비율이 비슷하였다.
2. 각각 14개, 16개의 MDR1, MRP3 유전자 변이를 발견하였으나 이 중 정상인과 환자 간에 통계적으로 유의한 빈도 차이를 보이는 변이는 없었다.
3. MRP2 유전자의 경우 일배체형을 구성한 결과 ‘간세포형’ 독성 간염 환자와 ‘담즙정체형/혼합형’ 독성 간염 환자에서 각각 1개의 일배체형이 통계적으로 정상인과 유의한 빈도 차이를 보였고 이는 MRP2 유전자의 promoter 부위의 변이 때문임을 알 수 있었다.
4. ‘간세포형’ 독성 간염 환자에서 유의한 빈도 차이를 보인 GATG 일배체형은 wild type 일배체형에 비해 promoter 활성이 감소하였다.
5. ‘담즙정체형/혼합형’ 독성 간염 환자에서 유의한 빈도 차이를 보

인 (-)GCG 일배체형은 wild type 일배체형에 비해 promoter 활성이 감소하였고, chenodeoxycholic acid와 같은 간 독성 약물을 처리한 후의 활성 증가 정도도 wild type 일배체형에 비하여 감소하였다.

본 연구 결과 MRP2 유전자는 독성 간염과 관련성이 높으며 특히 변이에 따른 promoter의 활성 감소가 발병에 중요한 결정 인자임을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Meisel C, Roots I, Cascorbi I, Brinkmann U, Brockmoller J. How to manage individualized drug therapy: Application of pharmacogenetic knowledge of drug metabolism and transport. Clin Chem Lab Med 2000;38(9):869-876.
2. Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistances to cholchicine, doxorubicin and vinblastine. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:3004-3008.
3. Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1(P-glycoprotein): Recent advances and clinical relevance. Clin Pharmacol Ther. 2004;75(1):13-33.
4. Bera TK, Iavarone C, Kumar V, Lee S, Lee B, Pastan I. MRP9, an unusual truncated member of the ABC transporter superfamily, is highly expressed in breast cancer. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99(10):6997-7002.
5. Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. Gastroenterology 2004;126(1):322-342.
6. Peter J. Meier, B. Stieger. Bile Salt Transporters. Annu Rev Physiol 2002;64:635-661.
7. Gerk PM, Vore M. Regulation of expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and its role in drug disposition. JPET 2002;302:407-415.
8. Kartenbeck J, Leuwchnner U, Mayer R, Keppler D. Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson

- syndrome. *Hepatology* 1996;23:1061-1066.
9. Keitel V, Kartenbeck J, Nies AT, Spring H, Brom M, Keppler D. Impaired protein maturation of the conjugate export pump multidrug resistance protein 2 as a consequence of a deletion mutation in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 2000;32:1317-1328.
 10. Cui Y, Konig J, Buchholz JK, Spring H, Leier I, Keppler D. Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol. Pharmacol* 1999;55:929-937.
 11. Kawabe T, Chen ZS, Wada M, Uchiumi T, Ono M, Akiyama S, et al. Enhanced transport of anticancer agents and leukotriene C₄ by the human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT/MRP2). *FEBS Lett* 1999;456:327-331.
 12. van Aubel RA, Koenderink JB, Peters JG, van OS CH, Russel FG. Mechanism and interaction of vinblastine and reduced glutathione transport in membrane vesicles by the rabbit multidrug resistance protein Mrp2 expressed in insect cells. *Mol Pharmacol* 1999;56:714-719.
 13. Zeng H, Liu G, Rea PA and Kruh GD. Transport of amphipathic anions by human multidrug resistance protein 3. *Cancer Res* 2000;60(17):4779-4784.
 14. Inokuchi A, Hinoshita E, Iwamoto Y, Kohno K, Kuwano M, Uchiumi T. Enhanced expression of the human multidrug resistance protein 3 by bile salt in human enterocytes. *J Biol Chem* 2001;276(50):46822-46829.

15. Stockel B, König J, Nies AT, Cui Y, Brom M, Keppler D. Characterization of the 5'-flanking region of the human multidrug resistance protein 2 (MRP2) gene and its regulation in comparison with the multidrug resistance protein 3 (MRP3) gene. *Eur J Biochem* 2000;267:1347-1358.
16. Kerb R, Sven Hoffmeyer S, Brinkmann U. ABC drug transporter: hereditary polymorphisms and pharmacological impact in MDR1, MRP1 and MRP2. *Pharmacogenomics* 2001;2(1):51-64.
17. Schwab M, Michel Eichelbaum M, Fromm MF. Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003;43:285-307.
18. Hoffmeyer S, Burk O, Richter V, Arnold HP, Brockmoller J, John A, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: Multiple sequence variation and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:3473-3478.
19. Chan L, Lowes S, Hirst BH. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharmaceut Sci* 2004;(21):25-51.
20. Maddrey WC. Drug-induced hepatotoxicity. *J Clin Gastroenterol* 2005;39(2):S83-S89.
21. Danan G, Benichou C. Causality assessment of adverse reactions to drugs- I. Novel method based on the conclusions of international consensus meetings: Application to drug-induced liver injuries. *J Clin Epidemiol* 1993;46(11):1323-1330.
22. Zollner G, Fickert R, Zenz R, Fuchsbichler A, Stumptner C,

- Kenner L, et al. Hepatobiliary transporter expression in percutaneous liver biopsies of patients with cholestatic liver disease. *Hepatology* 2001;33:633–646.
23. Kauffmann HM, Schrenk D. Sequence analysis and functional characterization of the 5′-flanking region of the rat multidrug resistance protein 2 (mrp2) gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;245:325–331.
 24. Tanaka T, Uchiumi T, Hinoshita E, Inokuchi A, Toh S, Wada M, et al. The human multidrug resistance protein 2 gene: Functional characterization of the 5′-flanking region and expression in hepatic cells. *Hepatology* 1999;30:1507–1512.
 25. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005;21(2):263–265.
 26. Mor-Cohen R, Zivelin A, Rosenberg N, Goldberg I, Seligsohn U. A novel ancestral splicing mutation in the multidrug resistance protein 1 gene causes Dubin-Johnson syndrome in Ashkenazi Jewish patients. *Hepatology research* 2005;31:104–111.
 27. Mor-Cohen R, Zivelin A, Rosenberg N, Shani M, Muallem S, Seligsohn U. Identification and functional analysis of two novel mutations in the multidrug resistance protein 2 gene in Israeli patients with Dubin-Johnson syndrome. *J Biol Chem* 2001;276(40):36923–36930.
 28. Fardel O, Jigorel E, Vee ML, Payen L. Physiological, pharmacological and clinical features of the multidrug resistance protein 2. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2005;59:104–114.

29. Zhang J, Huang W, Qatanani M, Evans RM, Moore DD. The constitutive androstane receptor and pregnane X receptor function coordinately to prevent bile acid-induced hepatotoxicity. *J Biol Chem* 2004;279(47):49517-49522.
30. Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM. Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem* 2002;277(4):2908-2915.
31. Fickert P, Zollner G, Fuchsbichler A, Stumptner C, Pojer C, Zenz R. Effects of ursodeoxycholic and cholic acid feeding on hepatocellular transporter expression in mouse liver. *Gastroenterology* 2001;121:170-183.
32. Zollner G, Fickert P, Fuchsbichler A, Silbert D, Wagner M, Arbeiter S. Role of nuclear bile acid receptor, FXR, in adaptive ABC transporter regulation by cholic and ursodeoxycholic acid in mouse liver, kidney and intestine. *J Hepatol* 2003;39(4):480-488.
33. Beuers U, Bilzer M, Chittattu A, Kullak-Ublick GA, Keppler D, Paumgartner G, et al. Tauroursodeoxycholic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2, into canalicular membranes and stimulates organic anion secretion by protein kinase C-dependent mechanism in cholestatic rat liver. *Hepatology* 2001;33(5):1206-1216.
34. Kaestner KH. The hepatocyte nuclear factor 3 (HNF3 or FOXA) family in metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11(7):281-285.
35. Tanaka Y, Yoshikawa M, Kobayashi Y, Kuroda M, Kaito M,

- Shiroy A, et al. Expression of hepatobiliary organic anion transporters and bilirubin-conjugating enzyme in differentiating embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:324–330.
36. Welsheimer T, Newbold JE. A functional hepatocyte nuclear factor 3 binding site is a critical component of the duck hepatitis B virus major surface antigen promoter. *J Virology* 1996;70(12):8813–8820.
 37. Verschuur M, de Jong M, Felida L, de Maat MPM, Vos HL. A hepatocyte nuclear factor-3 site in the fibrinogen β promoter is important for interleukin 6-induced expression, and its activity is influenced by the adjacent -148C/T polymorphism. *J Bio Chem* 2005;280(17):16763–16771.
 38. Huang MC, Kelly KL, Spear BT. The mouse alpha-fetoprotein is repressed in HepG2 hepatoma cells by hepatocyte nuclear factor-3 (FOXA). *DNA and Cell Biology* 2002;21(8):561–569.

Abstract

Genetic variation and functional change of drug transporters in
Korean

Ji Ha Choi

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Kyung Hwan Kim)

The genetic difference in drug metabolizing enzymes and drug transporters causes the variable drug response to the same kind of and dose of drugs. To examine its correlation with the toxic hepatitis, the genetic variation of MDR1, MRP2, and MRP3, which are known to be important drug transporters, and their functions were investigated in toxic 94 hepatitis patients and 110 healthy volunteers.

Genetic analysis showed that MRP2 haplotypes have a statistical significance in their frequencies between the toxic hepatitis patients and the healthy volunteers. We could infer that the genetic variations in the promoter region might have an effect on the function of the MRP2. To examine this hypothesis, we did luciferase assay for the genetic variations in the promoter region and we found that the function of GATG and (-)GCG haplotype was significantly decreased in 'hepatocellular type' toxic hepatitis

and 'cholestatic/mixed type' toxic hepatitis patients compared with that of wild-type haplotype. Especially, we also found chenodeoxycholic acid which can induce hepatotoxicity less increased the promoter activity of (-)GCG haplotype than that of wild-type haplotype.

When the promoter activity in MRP2 is decreased, it could be more difficult to secrete drugs and bile acid into bile duct. This could be the reason why the same drug has more toxic effects on the liver in toxic hepatitis patients than healthy volunteers.

These results showed that MRP2 is closely related to toxic hepatitis and especially the decreased activity of MRP2 promoter is an important predisposing factor of it.

Key Words : MDR, MRP, genetic variation, toxic hepatitis, haplotype, promoter