

## 신생아 담즙정체성 간질환에서 간조직 유전자의 발현 양상

여수 성심종합병원 소아과, \*경북대학교 의과대학 소아과학교실, †면역학교실, ‡소아외과학교실,  
§울산대학교 의과대학 서울아산병원 소아과학교실, ||계명대학교 의과대학 소아외과학교실

최보화 · 최병호\* · 정은정† · 김경모§ · 김행미\*  
박진영‡ · 박우현|| · 김문규† · 김정철†

### Patterns of Intrahepatic Gene Expression in Neonatal Cholestasis

BoHwa Choi, M.D., Byung Ho Choe, M.D.\*, Eun Jung Chung, M.D.†,  
Kyung Mo Kim, M.D.§, Heng Mi Kim, M.D.‡, Jin Young Park, M.D.†,  
Woo Hyun Park, M.D.||, Moon Kyu Kim, M.D.† and Jung Chul Kim, M.D.†

Department of Pediatrics, Seongsim General Hospital, Yeosu, Departments of \*Pediatrics,  
† Immunology and ‡ Pediatric Surgery, Kyungpook National University School of Medicine, Daegu,  
§ Department of Pediatrics, Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine, Seoul,  
|| Department of Pediatric Surgery, Keimyung University Dongsan Medical Center, Daegu, Korea

**Purpose:** To identify genes specifically expressed in biliary atresia, we compared the patterns of gene expression between biliary atresia and neonatal hepatitis syndrome using cDNA microarray analysis.

**Methods:** Liver tissues were taken from livers of 11 patients (7 patients with biliary atresia and four with neonatal hepatitis) with neonatal cholestasis by needle biopsy. Normal control could be obtained from donor liver tissue during living-related liver transplantation. Total RNA was extracted from each samples and reversely transcribed to make cDNA. Then fluorescent cDNA were pooled and hybridized to the clones on the microarray. Fluorescence intensities at the immobilized targets were measured. Utilizing cDNA arrays of 4.7 K human genes, gene expression profiles were analyzed.

**Results:** Among 4,700 microarray clones, 17 cDNA clones were significantly over-expressed in all 11 patients with neonatal cholestasis, while 20 clones were significantly decreased. Genome-wide expression analysis was carried out in livers obtained at the time of diagnosis. We could identify 49 genes, in which there showed differential expression between biliary atresia and neonatal hepatitis syndrome.

접수 : 2005년 7월 21일, 승인 : 2005년 8월 29일

책임저자 : 최병호, 700-721, 대구광역시 중구 삼덕동 2가 50, 경북대학교 의과대학 소아과학교실

Tel: 053-420-5704, Fax: 053-425-6683, E-mail: bhchoi@knu.ac.kr

이 연구는 2005년도 경북대학교병원 생명의학연구소 연구비의 지원으로 이루어졌음.

**Conclusion:** This study shows the pattern of differentially expressed genes in biliary atresia and neonatal hepatitis syndrome. We believe that this study can contribute to the understanding of pathogenesis of neonatal cholestasis. (*Korean J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 8: 177~193)

**Key Words:** Neonatal cholestasis, Biliary atresia, Gene expression, cDNA microarray analysis

## 서 론

담즙정체(cholestasis)란 십이지장으로 담즙 배설이 감소하는 것을 말하며, 이는 간세포에서 담즙의 형성장애, 담세관으로의 담즙의 분비장애 혹은 간외담도계의 질환에 의해 유발될 수 있으며, 담즙 배설의 저하로 인해 담즙을 구성하는 포합빌리루빈, 담즙산 및 콜레스테롤의 혈액 내로 유입과 조직에 침착을 유발하여 임상증상이 나타난다. 특히 신생아기에는 간의 배설기능이 미숙한 상태이기 때문에 감염, 대사성질환 등에 의해서 기능적 혹은 구조적인 담즙 배설의 장애가 쉽게 발생한다<sup>1)</sup>.

신생아 및 초기 영아기에 담즙정체는 다양한 질환에 의해서 발생할 수 있으나, 담도 폐쇄증과 신생아 간염이 국내 영아기 담즙정체의 주요한 원인이 된다<sup>2)</sup>. 담도 폐쇄증은 담도에 염증을 일으키고 담도를 파괴함으로써 간의 섬유화를 진행시켜 담도성 간경변을 초래하여 결국 담도 폐쇄증 환자의 70~80%에서 간이식을 필요로 한다<sup>2-4)</sup>. 반면 신생아 간염은, 생후 3개월 이하의 신생아에서 담도 폐쇄증을 제외한 담즙정체를 가져오는 모든 경우를 포함하며 이는 감염이나 대사성 질환과 같이 원인이 밝혀진 경우도 있으나, 원인이 밝혀지지 않은 경우가 대부분이며, 예후는 간조직의 손상과 섬유화 정도에 따라 다르나, 대부분 완전 회복을 보인다<sup>2,5)</sup>. 이 두 질환군 간의 예후가 이렇게 큰 차이를 보이므로 조기 감별이 무엇보다 중요하지만, 감별이 되지 않는 경우 현재로서는 실험적 개복만이 확실한 감별 진단 방법이다<sup>6)</sup>.

담도 폐쇄증의 발생에는 바이러스성 감염, 유전

적 요인, 형태학적 발생의 장애, 면역계의 이상 반응 등 여러 유발 인자들이 관여하지만, 원인에 관계없이 공통적으로 염증 반응과 간내 섬유화가 일어나므로 담도 폐쇄성 간경변 조직과 다른 간질환 조직 간의 유전자 발현의 차이를 비교하는 것은 담도성 경화 과정을 이해하는데 도움을 줄 뿐 아니라, 이는 간이식을 받지 않은 담도 폐쇄증 환자의 예후 판정에도 중요하다. 이러한 이유로 최근 담도 폐쇄증 환자의 간조직에서 유전자 변이를 찾고자 하는 시도가 보고되고 있다<sup>7-10)</sup>. 또한 소수의 몇몇 유전자만을 분석하는 것보다는 여러 유전자의 발현 양상을 동시에 분석하는 것이 간손상의 발생과정을 이해하는데 보다 용이한 접근방식으로 인정되면서 한번의 실험으로 수 천종의 유전자를 비교할 수 있는 microarray 분석법이 최근 유전자발현 연구의 일반적인 방법으로 이용되고 있다<sup>11,12)</sup>.

본 연구에서는 담도 폐쇄증 환자의 간조직과 신생아 간염 증후군 환자의 간조직을 이용하여 microarray 분석을 통해 유전자 발현의 차이를 살펴봄으로써 이 두 질환의 조기 감별에 유용한 유전자를 밝히고 담도 폐쇄증의 발생과 진행, 간경변 등에 관여하는 유전자를 조사하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 환자와 간생검

담즙정체를 주소로 경북대학병원, 서울아산병원, 계명대학교 동산병원에 입원한 11명의 환자에서 진단을 위해 시행한 간조직 생검시 일회 침생검에서 얻어진 1.8 cm의 간조직 중 일부인 2 mm를 즉시 액체질소에 얼려 실험에 이용하였다. 11명의 환자 중

7명은 담도 폐쇄증이었고, 나머지 4명은 신생아 간염 증후군으로 진단되었다.

환자들의 진단을 위한 간생검은 대부분 생후 2개월 전후에 시행되었고, 신생아 간염 증후군 환자(NH4)는 신생아 간염으로 관찰 중 장기간 호전을 보이지 않아서 간생검을 시행한 경우로 생후 10개월 경에 조직 검사를 시행하였다. 담도 폐쇄증의 모든 환자들은 진단 후 곧 간문-장문합술(hepatic portoenterostomy)을 시행하였으나, 이중 한 명은 간경변 진행으로 사망하였다. 신생아 간염 증후군 환자 3명은 조직 검사 후 2~3주 내 포합형빌리루빈이 2 이하로 떨어져 황달이 호전되었으나, NH3은 2개월이 지나서 회복을 보였다(Table 1).

환자들 모두 포합형 고빌리루빈혈증을 보였고, 합성 기능을 나타내는 알부민은 NH1과 NH2를 제외하고는 정상보다 낮았다. 간조직학적 소견은 염증과 섬유화 정도를 변형된 histological grading and staging에 따라 분류하였고<sup>13)</sup>, 담도 폐쇄증 환자들은 모두 염증과 섬유화를 보였고, 신생아 간염 증후군 환자들에서는 염증 소견은 있으나, NH3을 제외하고는 섬유화 정도가 미비하거나 없었다(Table 1).

생후 2개월 전후의 정상 신생아의 간조직은 윤리적인 문제로 얻을 수 없어 생체 부분 간이식 수술 중 수술실에서 성인 공여자로부터 1 g 정도의 조직을 얻어 정상 대조군으로 이용하였다.

Table 1. Clinical and Biochemical Characteristics of Patients

Patients	Age at biopsy (days)	Sex	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	Total/Direct bilirubin (mg/dL)	Albumin (g/L)	PT (INR)	Biopsy: inflammation/fibrosis	Portoent erostomy	Recovery time of jaundice in NH*
BA1	62	M	175	85	8.5/4.6	3.2	1.15	Mild/Most portal, septa	Yes	
BA2	50	M	235	116	8.8/5.2	3.2	1.21	Moderate /Most portal	Yes	
BA3	60	M	182	119	6.8/4.2	3.3	1.08	Mild/Most /portal, bridging	Yes	
BA4	55	M	451	497	12.5/7.7	3.5	1.04	Mild /Most portal	Yes	
BA5	61	M	154	123	12.3/12	3.9	1.06	Moderate/Most portal, septa	Yes	
BA6	56	M	1,483	518	11.2/7.4	3.0	0.99	Marked /Most portal	Yes	
BA7	44	F	66	43	12.9/7.9	2.7	1.08	Marked /Most portal	Yes	
NH1	74	M	273	282	6.7/5.7	4.0	1.11	Mild /Some portal	No	3 weeks
NH2	69	M	155	146	8.8/7.8	4.1	1.12	Mild /None	No	2 weeks
NH3	65	M	164	89	6.0/4.2	3.7	1.09	Mild /Most portal	No	2 months
NH4	292	M	1,403	921	10.9/6.3	2.8	1.68	Marked /Some portal	No	2 weeks

\*the time when direct bilirubin drops below 2.0 mg/dL. AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, PT: prothrombin time, NH: neonatal hepatitis syndrome, BA: biliary atresia.

2. 간조직으로부터 총 RNA와 mRNA의 추출

총 RNA의 분리는 변형된 phenol/chloroform/isomylalcohol법을 이용하였다. Trizol (Life Technologies) 용액으로 세포를 녹인 후 1/10 양의 1-bromo-3-chloropropane을 첨가하여 원심분리하여 상층액을 동량의 isopropanol이 담긴 새 tube에 옮기고 inverting하여 원심분리 후 RNA pellet을 얻었다. 얻은 RNA pellet을 75% 에탄올로 세척 후 공기 중에서 건조시키고 diethylpyrocarbonate (DEPC)로 처리된 증류수에 다시 녹여 UV spectrometer (DU 530, Beckman, USA)로 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 순도와 농도를 측정하였다. 3~5µg의 RNA를 변성 1.0% formaldehyde agarose gel에 전기영동 하여 품질을 확인하였다. mRNA는 oligotex mRNA midi kit (Qiagen, Chatsworth, CA, USA)를 이용하여 분리하였다. 침생검으로 얻어진 조직에서 분리된 RNA가 바로 microarray에 이용하기에 양이 충분치 않았으므로 double stranded cDNA를 합성한 다음 T7 RNA polymerase를 이용하는 비례적 RNA 증폭 과정을 거쳐 microarray에 이용하였다(Fig. 1).

3. Double stranded cDNA의 합성

RNA용액을 Speedvac으로 2µL 정도로 농축하고 여기에 7µL의 DEPC-증류수를 넣고 잘 섞고, 1µL (1µg/µL)의 oligo-dT를 첨가 후 65°C에서 10분간 반응시킨 후 얼음에 냉각시키고, 4µL의 5×first strand buffer, 2µL의 0.1 M DTT, 1µL의 RNasin, 1µL의 10 mM dNTP, 1µL Superscript II (GibcoBRL)를 첨가한 후 37°C에서 1시간 반응시켜 first strand를 합성하였다. 위 반응액에 106µL의 DEPC water, 15µL의 10×second strand buffer (200 mM Tris pH6.9, 900 mM KCl, 46 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 mM Nicotine adenine dinucleotide, 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 3µL의 10 mM dNTP, 1µL의 *Escherichia coli* DNA ligase (10 U/µL), 4µL의 *E. coli* DNA polymerase I (10 U/µL), 1µL의 RNase H (2 U/µL)를 첨가하여 16°C에서 2시간동안 반응시키고, 2µL의 T4 DNA polymerase를 넣고 10분 동안 더 반응시킨 후 7.5µL의 1 M NaOH/2 mM EDTA를 첨가하여 65°C에서 10분간 처리하여 second strand 합성반응을 중지시키고 rRNA 및 tRNA를 분해시켰다. 이 용액에 150µL의 phenol-chloroform 용액으로 추출하여 수층을 취하여 70µL의 7.5 M

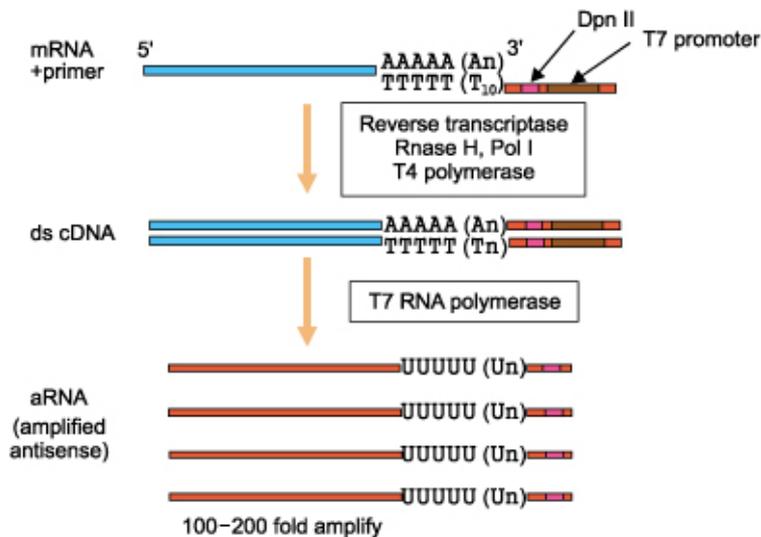


Fig. 1. The principle of linear RNA amplification using T7 RNA polymerase.

ammonium acetate와 1 mL의 에탄올(-20°C)을 첨가하여 원심 분리하여 cDNA를 침전시키고 100µL의 에탄올로 세척 후 건조시켰다. 침전물을 10µL의 DEPC water에 녹인 후 Microcon- 30을 이용하여 cDNA를 정제 및 농축하여 16µL 이하로 만들었다.

**4. T7 RNA polymerase를 이용하는 RNA의 비례적 증폭**

Ampliscribe T7 Transcription kit (Epicentre Technologies)를 사용하여 RNA를 증폭하였다. 8µL의 double-stranded cDNA, 2µL의 10×Ampliscribe T7 buffer, 각각 1.5µL의 100 mM ATP, CTP, GTP, UTP, 2µL의 0.1 M DTT, 2µL의 T7 RNA polymerase를 첨가하여 42°C에서 2시간 반응시킨 후 phenol-chloroform용액으로 추출하고 Microcon-30으로 증폭된 RNA를 정제하여 10µL로 농축하였다.

**5. cDNA microarrays**

**1) mRNA에서 형광 DNA probe 제작:** Probe 제작은 DeRisi JL 등<sup>14)</sup>이 기술한 방법을 이용하여 약간의 변형을 가하였다. 역 전사효소는 Superscript II RNase H (Life Technologies)를 사용하였다. Cy-3dCTP

와 Cy-5dCTP는 Amersham Pharmacia Biotech로부터 구입하였다. 각 역전사 반응에는 증폭된 mRNA 3µg에 0.5µg의 oligo (dT) primer를 사용하였다. 역전사 후 1.5 M sodium hydroxide 1.0µL와 30 mM EDTA 1.0µL를 넣어 65°C에서 10분간 처리하고 TE 완충액(pH 7.4) 468µL를 넣어 중화 시켰다. 반응액은 Micron 30 (Millipore)을 사용해서 농축시키고, Cy-3 (녹색, 정상대조군)과 Cy-5 (적색, 담즙 정체 환자군) 형광 부착된 probe를 3×SSC, 0.1% SDS, 0.5 mg/mL poly A blocker (Amersham Pharmacia Biotech), 0.5 mg/mL yeast tRNA (Life Technologies)와 섞어 최종 양이 25µL가 되게 하였다.

**2) Microarray Hybridization:** cDNA array는 경북대학교 의과대학 면역학교실에서 human dermal papilla cell의 mRNA로 만든 7 종류의 cDNA library로부터 분리된 4,700 cDNA 클론으로 array를 자체 제작하여 사용하였다. Arrays를 10 mg/ml BSA, 3.5×SSC, 0.1% SDS 용액에 넣어 50°C에서 20분간 prehybridization한 후 증류수, isopropanol의 순서로 washing 하고 원심분리하여 slide를 건조시켰다. 준비된 probe를 95~100°C에서 2분간 끓여서 spin down하여 array에 점적하고 cover slide를 덮어 CMT-

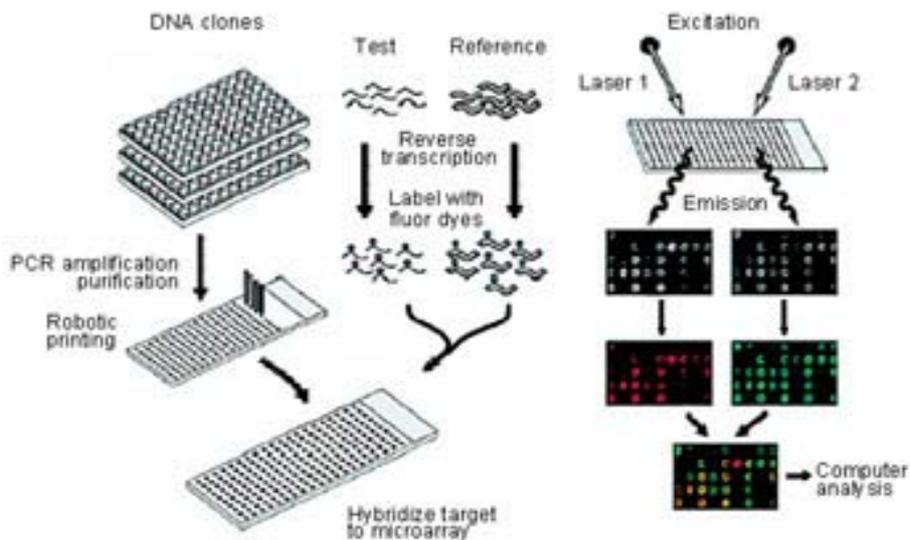


Fig. 2. cDNA microarray schema.

ybridization chamber (Corning Inc.)에 넣어 50°C에서 20시간 hybridization 하였다(Fig. 2). Hybridization 후 array를 상온에서 low stringency wash buffer (0.1×SSC/0.1% SDS)에 한번, high stringency wash buffer (0.1×SSC)에 두 번 washing하여 원심분리 후 slide를 건조시켰다.

### 6. Scanning과 분석

Laser confocal 방식의 Scanarray 4000 (GSI Lumonics, USA) microarray 스캐너를 사용하여 Cy-3과 Cy-5의 상대적 발현수치를 측정하고 Quantarray software (version 2.0.1, GSI Lumonics)를 이용하여 각 이미지를 합성하고 분석하였다. 담즙 정체증 환자의 간조직과 정상 대조군 간조직에서의 유전자별 발현

비율(Cy-5/Cy-3 비, 적색과 녹색의 intensity 비)을 결정하여 2배 이상 차이를 보이는 경우를 의미 있는 유전자로 분류하였고, 각각의 유전자의 평균치를 기록하였다. 결과는 각각의 array에 있는 housekeeping gene인  $\beta$ -actin과 GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase)를 이용하여 보정하였다.

### 결 과

#### 1. 담즙정체를 보인 환자에서의 유전자 발현의 양상

담즙정체를 보인 11명의 환자들의 간조직에서 얻은 RNA로부터 합성한 cDNA probe를 4,700 cDNA microarray에 hybridization한 결과 신생아 간염 증후

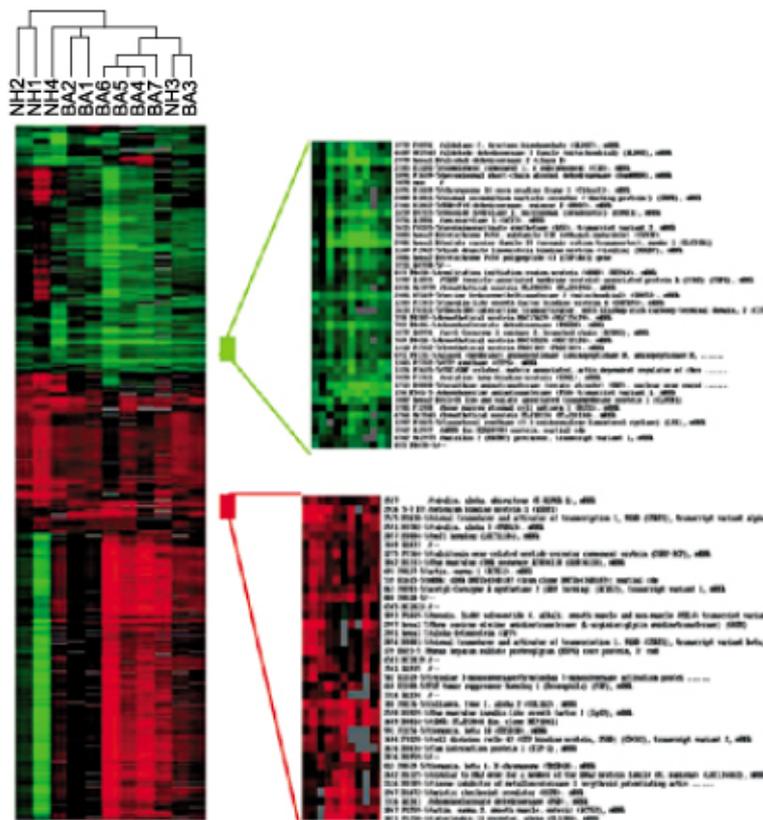


Fig. 3. Tree view image of clustered data set of 4,700 genes in livers of patients with neonatal cholestasis. The vertical axis corresponds to genes, and the horizontal axis to patients. Red colors indicate up-regulated transcripts and green colors indicate down-regulated transcripts in each patient.

**Table 2.** List of Differentially Expressed Genes in Neonatal Cholestasis

Genbank	Gene name	Fold	Function
<b>Up-regulated</b>			
NM_000089	Collagen, type I, alpha2	4.4	Extracellular matrix structural constituent
NM_007315	STAT1, transcript variant alpha	4.3	Cytokine receptor signal transducer activity
AK025719	Insulin-like growth factor 2AP	4.2	Insulin-like growth factor binding
NM_010514	Mus musculus Igf2	3.9	Insulin-like growth factor receptor binding
NM_001482	Glycine amidinotransferase	3.9	Creatine biosynthesis
NM_003944	Selenium binding protein 1	3.6	Selenium binding
NM_001615	Actin gamma 2, smooth muscle, enteric	3.5	Structural constituent of cytoskeleton
NM_004039	Annexin A2	3.1	Calcium-dependent phospholipids binding
NM_000366	Tropomyosin 1 alpha	2.9	Structural constituent of cytoskeleton
NM_006009	Tubulin, alpha 3	2.8	Microtubule-based movement
NM_152713	Integral membrane protein 1	2.6	Protein amino acid glycosylation
NM_005977	Ring finger protein (C3H2C3 type)6	2.6	Ubiquitin-protein ligase activity
NM_006082	Tubulin, alpha, ubiquitous	2.6	Microtubule-based movement
NM_002306	Galectin 3	2.4	Sugar binding, IgE binding
NM_016303	WW domain binding protein 5	2.2	Binding of polyproline ligands
NM_044472	CDC42, transcript variant 2	2.1	Acting filament organization, macrophage differentiation
NM_014604	Tax interaction protein 1	2.1	Intracellular signaling cascade
<b>Down-regulated</b>			
	Alcohol dehydrogenase 2 (class I)	0.3	
NM_000274	Ornithine aminotransferase	0.3	Mitochondrial precursor, Defects in OAT are the cause of hyperornithinemia
NM_005412	Serine hydroxymethyltransferase 2	0.3	Mitochondrial precursor, Interconversion of serine and glycine, Key enzyme in the biosynthesis of purines, lipids, hormones and other components
NM_058179	Phosphoserine aminotransferase	0.3	Second step-catalyzing enzyme for serine biosynthesis
	Cytochrome P450, subfamily IIE	0.3	Microsomal monooxygenase, may be involved in such varied processes as gluconeogenesis, hepatic cirrhosis, diabetes, and cancer
NM_006623	Phosphoglycerate dehydrogenase	0.3	C-terminal binding protein, transcriptional repressor, May play a role during cellular proliferation
NM_001905	CTP synthase	0.4	Biosynthesis of phospholipids and nucleic acids, Key role in cell growth, development, and tumorigenesis.
	CLPTM1	0.4	Cleftlip and palate associated transmembrane protein

Table 2. Continued

Genbank	Gene name	Fold	Function
NM_139045	SWI/SNF related, regulator	0.4	Transcriptional coactivator cooperating with nuclear hormone receptors to potentiate transcriptional activation
NM_000071	Cystathionine-beta-synthase	0.4	Methylcysteine synthase, defects in CBS are a cause of homocystinuria
NM_000690	Aldehyde dehydrogenase 2	0.4	Mitochondrial precursor
NM_005165	Aldolase C, fructose-bisphosphate	0.4	Brain-type aldolase
	Cytochrome P450 polypeptide 43	0.4	Metal ion binding, unspecific monooxygenase activity
NM_004785	Solute carrier family 9	0.4	Sodium/hydrogen exchanger
NM_032750	Hypothetical protein MGC15429	0.5	unknown
NM_025230	Hypothetical protein PRO2389	0.5	unknown
NM_002569	Paired basic amino acid cleaving enzyme	0.5	Represent the ubiquitous endoprotease activity within constitutive secretory pathways
NM_001552	IGFBP4	0.5	Binding of this protein prolongs the half-life of the IGFs and alters their interaction with cell surface receptors
NM_007310	Catechol-O-methyltransferase	0.5	Inactivation of catecholamine neurotransmitters and catechol hormones
NM_003500	Achl-Coenzyme A oxidase 2	0.5	Absent in patients suffering from Zellweger syndrome

For functional assignment, the biological properties of each gene were obtained from unigene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>).

군과 담도 폐쇄증의 두 군으로 나누어짐을 관찰할 수 있었다. 특히 담도 폐쇄증 환자들은 모두 일정한 양상을 보여 신생아 간염 증후군과 감별이 가능하였다. 임상 증상이 오래가고 간조직 소견에서 섬유화를 보였던 NH3은 유전자 발현이 담도 폐쇄증에 비슷하였으며 생김 시기가 늦었던 NH4는 BA와 NH1, NH2 중간의 발현 양상을 보여주었다(Fig. 3).

이들 담즙정체를 보인 모든 환자의 간조직에서 17종의 유전자 클론은 발현이 증가하였고, 20종은 발현이 감소하였다. 발현의 증가를 보인 유전자들은 collagen, tubulin, actin과 같이 세포 골격을 이루는 단백질을 만들어내는 유전자들이었고, 발현이 감소된 유전자는 ornithine aminotransferase, serine hydroxymethyltransferase, phosphoserine aminotransferase, phosphoglycerate dehydrogenase 등 간세포에

서 생합성 되는 효소들을 합성해내는 유전자들이었다(Table 2).

## 2. 담도 폐쇄증과 신생아 간염 증후군에서의 유전자 발현의 차이

NH3과 NH4는 담도 폐쇄증 환자와 유전자 발현의 차이를 보여주기에는 특이하지 않았다. 전체 발현 양상을 살펴보았을 때 NH1, NH2와 담도 폐쇄증 환자 전체와는 현저한 차이를 보여 주었고 유전자 분석을 통해 모두 49종의 유전자 클론에서 발현의 차이를 볼 수 있었다(Fig. 4).

담도 폐쇄증에서는 발현이 증가하였으나 신생아 간염 증후군에서는 발현이 감소된 유전자는 24종으로 cystatin locus on chromosome 20, hypothetical protein FLJ10826, immunoglobulin heavy locus on chro-

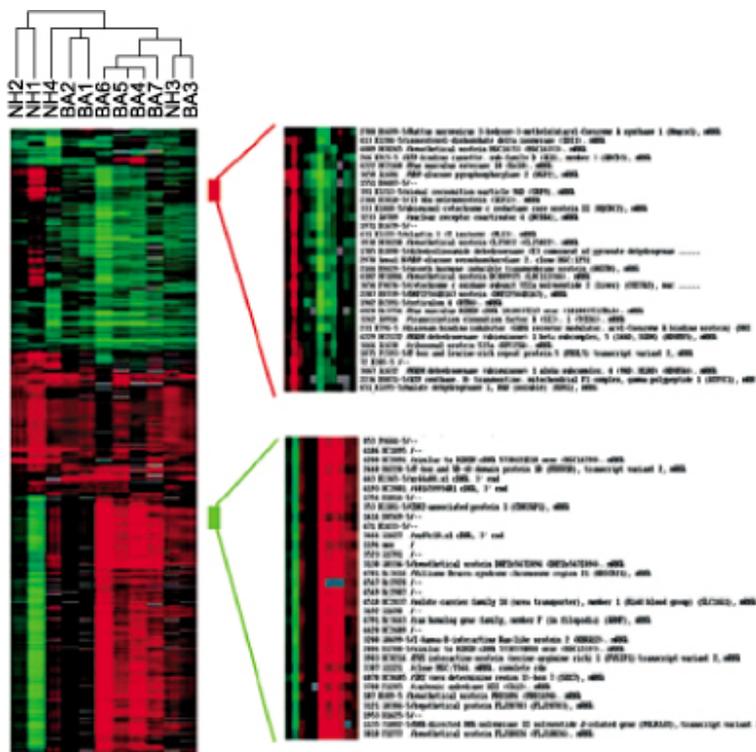


Fig. 4. Tree view image of clustered data set of 4,700 genes in livers of patients with neonatal cholestasis. Red colors indicate up-regulated transcripts in neonatal hepatitis syndrome patient 1 and 2, but down-regulated in all biliary atresia patients. Green colors indicate up-regulated transcripts in all biliary atresia patients, but down-regulated in neonatal hepatitis syndrome patient 1 and 2.

mosome 14, protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12B, ras homolog gene family member F, SPFH domain family 2, CDK2-associated protein 1, CD3-epsilon-associated protein, solute carrier family 14 member 1, parahydroxybenzoate-polyprenyltransferase, I-kappa-B-interacting Ras-like protein 2, PABP-interacting protein 2, hypothetical protein PRO1496 유전자는 담도 폐쇄증에서 4배 이상 현저한 증가를 보였고, 또한 collagen, TGF- $\beta$ 1, lysyl oxidase-like 3와 같은 섬유화에 관여하는 유전자들이 담도 폐쇄증에서 증가를 보였다(Table 3).

반면 신생아 간염 증후군에서는 발현이 증가하였으나 담도 폐쇄증에서는 발현이 감소한 유전자는 모두 25종으로 특히 proteoglycan 1 secretory granule,

glypican 3, nuclear receptor coactivator 4, lysosomal-associated membrane protein 2, COX7A2, protease cysteine 1 (legumain) 유전자는 담도 폐쇄증에서 신생아 간염 증후군보다 4배 이상 발현의 감소를 보였다(Table 3).

### 고 찰

담도 폐쇄증은 생후 3개월 이내 신생아 담즙정체를 일으키는 주요 원인 중 하나로 발생 빈도는 아시아에서 신생아 8,000명당 한 명, 유럽에서는 신생아 18,000명당 한 명 정도이며, 여아에서 발생빈도가 더 높다. 생후 3개월 이내 간의 담도의 부분적 또는 완전 섬유성 폐쇄를 특징으로 하며 동시에 간내 담

**Table 3.** Differential Expression of Genes between Biliary Atresia and Neonatal Hepatitis Syndrome

Genbank	Gene name	Fold		Function
<b>Up-regulated in BA but Down-regulated in NH 1 and 2</b>		BA	NH	
NG_000839	Cystain locus on chromosome 20	6.2	0.2	Hematopoietic differentiation or inflammation
NM_018223	Hypothetical protein FLJ10826	4.6	0.5	Oxidoreductase activity
NG_001019	Immunoglobulin heavy locus on chromosome 14	4.6	0.4	Immune response, antigen binding
NM_032105	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12B	4.4	0.5	Regulation of muscle contraction
NM_019034	Ras homolog gene family, member F	4.2	0.4	Actin filament organization, cytoskeleton
NM_007175	SPFH domain family 2	4.2	0.6	Integral to membrane, unknown
NM_004642	CDK2-associated protein 1	4.2	0.4	Negative regulation of cell cycle
NM_012099	CD3-epsilon-associated protein	4.2	0.4	Immune response
NM_015865	Solute carrier family 14, member 1	4.1	0.4	Urea transporter, membrane protein
NM_015697	Para-hydroxybenzoate-polyprenyltransferase	4.1	0.4	Prenyltransferase, mitochondria
NM_017595	I-kappa-B-interacting Ras-like protein 2	4.1	0.4	I-kappaB kinase/NF-kappa B cascade
NM_016480	PABP-interacting protein 2 (PAIP2)	4.1	0.4	Negative regulation of translation
NM_018603	Hypothetical protein PRO1496	4.1	0.4	unknown
NG_000004	Genomic cytochrome P450, subfamily IIIA	3.9	0.6	Monooxygenase activity, electron transport
NM_130786	Alpha-1-B glycoprotein	3.8	0.5	Immunoglobulin supergene family
NM_006541	Thioredoxin-like 2	3.5	0.4	Cell redox homeostasis
NM_032603	Lysyl oxidase-like 3 (LOXL3)	3.4	0.3	Lysine 6 oxidase
NM_000660	TGFB1	3.1	0.4	Cell signaling, multifunctional
NM_033356	Caspase 8	3.0	0.4	Regulation of apoptosis
NM_001569	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1	3.0	0.4	Activation of NF-kB inducing kinase
NM_001256	Cell division cycle 27	3.0	0.5	Mitotic metaphase anaphase transition
NM_021020	Leucine zipper, putative tumor suppressor 1	2.7	0.4	Negative regulation of cell cycle
NM_001849	Collagen type VI, alpha 2	2.6	0.4	Extracellular matrix structural constituent
NM_000960	Prostaglandin 12 receptor (IP)	2.4	0.4	Signal transduction
<b>Down-regulated in BA but Up-regulated in NH 1 and 2</b>				
NM_002727	Proteoglycan 1, secretory granule	1.1	6.8	Hematopoietic proteoglycan core peptide
	Glypican 3 (GPC3)	0.7	4.7	Cell surface heparan sulfate proteoglycan
NM_005437	Nuclear receptor coactivator 4	0.5	3.9	Regulation of transcription
NM_013995	Lysosomal-associated membrane protein 2	0.8	3.8	Protection, maintenance, and adhesion of the lysosome

Table 3. Continued

Genbank	Gene name	Fold		Function
NM_001865	COX7A2	0.6	3.6	Nuclear-coded polypeptide chains of cytochrome c oxidase, the terminal oxidase in mitochondrial electron transport
	Protease cysteine 1 (legumain)	0.9	3.6	Processing of proteins for MHC class II antigen presentation in the lysosomal/endosomal system
NM_002635	Solute carrier family 25	0.9	3.3	Mitochondrial phosphate carrier protein
NM_004508	Isopentenyl-diphosphate catalyzes the interconversion of isopentenyl diphosphate (IPP) delta isomerase	0.8	2.9	Catalyzes the interconversion of (IPP), shown in peroxisomal deficiency diseases that there is reduction in IPP isomerase activity
NM_005274	G protein gamma 5	0.9	3.4	Guanine nucleotide binding protein (G protein)
	HSPCB 90kF protein 1	1.0	3.2	Molecular chaperone. Has ATPase activity
	Hypothetical protein (HSPC014)	1.2	3.3	unknown
NM_031059	Rattus norvegicus homeobox, msh-like 1	0.6	3.1	Transcriptional repressor, May play a role in limb-pattern formation. Acts in craniofacial development
NM_005888	Solute carrier family 25	0.8	3.0	Mitochondrial phosphate carrier protein
NM_000310	Palmitoyl-protein thioesterase 1 (PPT1)	1.3	2.7	Defects in PPT1 are the cause of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis 1
NM_012286	MORF-related gene X	0.9	2.6	Mortality factor 4-like protein 2, transcriptional activation of select genes
NM_006432	Niemann-Pick disease, type C2	1.2	2.8	Epididymal secretory protein
NM_005720	Actin related protein 2/3 complex	1.6	2.3	Control of actin polymerization in cells
NM_003945	ATP6V0E	1.0	2.4	Vacuolar ATPase is responsible for acidifying a variety of intracellular compartments in eukaryotic cells.
NM_004688	N-myc (and STAT) interactor	1.1	2.5	Augments cytokine-mediated STAT transcription
NM_017526	Leptin receptor gene-related protein	0.9	2.6	Regulation of fat metabolism, required for normal lymphopoiesis
NM_005032	Plastin 3 (T isoform)	0.6	2.5	Actin binding, calcium binding
NM_002492	NADH dehydrogenase 1 beta subcomplex, 5	0.7	2.4	NADH dehydrogenase
NM_004236	Thyroid receptor interacting protein 15	0.8	2.2	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 2 (Arabidopsis)(COPS2)
NM_139313	YME1-like 1	0.8	2.2	ATP-dependent metalloprotease FtsH1 homolog
NM_033307	Caspase 4	1.0	2.2	Apoptosis-related cysteine protease

For functional assignment, the biological properties of each gene were obtained from unigene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>).

도의 손상 및 섬유화를 동반한다<sup>2,3</sup>). 이 질환의 환아들은 비교적 전신상태는 양호하나 황달, 무담즙변과 간비대를 주증상으로 대부분 생후 일개월 이내 내원하게 되는데 신생아 감염, 대사성 또는 유전적 환, 총담관낭과 같은 다른 신생아 담즙정체를 가져오는 질환들과 조기 감별을 요한다. 생후 2~3개월 이내 진단되면 간문-장문합술(hepatic portoenterostomy)로 담즙의 흐름을 장내로 돌릴 수 있다. 그러나 성공적인 수술에도 불구하고 간내 담도의 염증과 섬유화가 진행되므로 담도성 간경변을 유발하여 결국 환아의 70~80%에서 간이식이 필요하게 된다. 담도 폐쇄증은 소아 영역에서 간이식의 적응증으로 가장 많은 부분을 차지하고 있다<sup>15~17</sup>). 또한 간문-장문합술이나 간이식을 받지 못하면, 담도성 간경변으로 진행하여 1세까지 50~80%의 환자가 사망하고 3세까지 90~100%의 환자가 사망하게 되므로 조기 진단이 매우 중요하다<sup>18</sup>).

임상적으로 담도 폐쇄증은 배아기(embryonic)형과 출산전후기(perinatal)형으로 구분된다. 배아기형은 복강내 장기의 위치 이상이나 심장 기형과 같은 다른 기형과 동반되어 나타나는 것으로 정상 담도형성에 관여하는 유전자의 변이로 담도 폐쇄를 가져와 이차적으로 간내 염증 반응으로 간내 담도의 손상 및 섬유화를 일으킨다. 출산전후기형은 출생시 정상 담도를 보이나 출산전후에 가해지는 바이러스 등의 감염이나 독소, 순환장애, 면역매개체 등과 같은 자극으로 인해 담도 상피 세포의 손상으로 야기된 면역 반응으로 간내외 담도에 손상을 주어 간경변을 야기하는 것으로 담도 폐쇄증의 65~90%를 차지한다<sup>6</sup>).

분자생물학과 유전학 등의 발달로 담도 폐쇄증의 병인론에 대한 많은 연구가 진행되면서 담도 폐쇄증은 담도의 폐쇄를 가져올 수 있는 여러 다른 질환들의 공동 표현형으로 이해되고 있다<sup>19,20</sup>). 특히 담도 폐쇄증의 출산전후기형에서 담도 손상을 유발하는 출산 전후 바이러스 감염원을 밝히기 위한 연구가 이루어 졌다. Tyler 등<sup>21</sup>)은 간, 담낭, 또는 담관의 잔류물 조직에서 시행한 RT-PCR로 담도 폐쇄증의 55%에서 reovirus RNA를 발견하였고, Riepenhoff-

Talty 등<sup>22</sup>)은 간담도 조직에서 시행한 RT-PCR로 18명의 담도 폐쇄증 환아 중 10명에서 rotavirus RNA를 발견하였다. 그 외 cytomegalovirus, papillomavirus, herpes virus-6 등도 보고되고 있다<sup>23,24</sup>). 세균 감염에 대한 보고들은 충분하진 않으나, 간문맥 대식세포에 세균의 내독소인 지질다당질(lipopolysaccharide)에 의해 활성화되는 단핵세포 표면 수용체인 CD14 발현이 증가되어 있어 이 CD14에 의해 대식세포가 활성화되어 담도 손상을 야기하는 것으로 보인다<sup>25</sup>).

면역학적 병인론으로 진단시 담도 폐쇄증의 조직 소견에서 간의 담도는 주로 섬유조직으로 구성되어 있는데 반해 간내 담도 주변에는 림프구, 대식세포와 호산구들의 침착을 보여 담도 손상에 관한 면역계의 작용이 시사되고 있으며 소담도 주변에 증가된 IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 등의 시토카인은 담도 폐쇄증이 Th1-세포와 관련된 염증반응임을 증명한다<sup>26,27</sup>). 이러한 소견은 다른 신생아 담즙정체 질환에서는 관찰되지 않는 담도 폐쇄증만의 특이적인 소견이라고 할 수 있다. 또한 간문맥의 대식세포의 침착 정도는 간문-장문합술 후 예후와 관련되어 보이며 이는 활성화된 대식세포가 생성한 IL-12와 IL-18도 Th1세포의 분화를 촉진할 뿐만 아니라 대식세포가 TNF- $\alpha$ 와 같은 세포독성 시토카인을 분비하므로 간문맥 주변에 대식세포의 침착이 많을수록 예후가 불량할 것으로 보인다<sup>28</sup>). 그 외 면역학적 요인에서 성공적인 간문-장문합술에도 불구하고 간경변이 진행되는 경우와 담도 폐쇄증으로 간이식을 받은 후에도 자가면역 감염의 발생이 보고되는 것을 예로 들 수 있으며 담도 폐쇄증에서 자가면역에 대한 유전적 소인으로 고려되고 있다<sup>29</sup>).

담도 폐쇄증의 확진은 시험적 개복술 혹은 수술 중 담관조영술을 통하여 섬유화된 간의 담도를 확인하는 것이지만 불필요한 시험적 개복술을 피하기 위해서 더 정확하고 비침습적인 진단 수단이 시도되어 왔다. 그러나 조기 진단이 중요함에도 불구하고 아직까지 신생아 감염과 담도 폐쇄증을 100% 감별할 수 있는 비침습적인 단일 검사법이 없다. 대변 색깔 등의 임상 양상이나 십이지장 내 담즙검사, 혈

액 검사 등에 의한 구분은 어렵다. 보편적 진단 수단인 초음파, 담관섬광조영술(cholescintigraphy), MR 담관조영술(cholangiography), 간생검 등으로 담도 폐쇄증을 배제할 수 없을 때는 시험적 개복술 및 수술 중 간조직 검사와 담관조영술을 해야 하는 경우도 있다.

최근 초음파로 triangular cord sign을 찾을 수 있게 됨에 따라 담도 폐쇄증의 진단에 많은 도움이 되고 있다. 이전에는 초음파로 담도 폐쇄증을 바로 진단하지는 못하였고 단지 총담관낭이나 담도 결석을 먼저 발견하기 위하여 사용되어 왔다. Triangular cord sign이란 문맥 분지 직상방에 원추모양의 섬유화된 부분이 초음파에서 삼각형 혹은 띠 모양의 문맥주위 메아리발생(echogenecity)으로 관찰되는 것을 말한다<sup>30)</sup>. 그러나 초음파는 담도계를 해부학적으로 정확하게 보는데 한계가 있으며 방사선과 의사의 경험에 따른 편차로 인해 결과(민감도 77~95%)가 많이 달라질 수 있다. 또한 담도 폐쇄증의 초기에는 간섬유화가 시작하는 시점이므로 진행된 문맥주위 echogenecity를 찾기가 어려울 수 있고, triangular cord sign이 보이지 않는다 하더라도 담도 폐쇄증의 가능성을 완전히 배제할 수는 없다. 담낭이 보이지 않거나 길이가 1.5 cm 미만일 경우 비정상적으로 생각하여 왔지만 낮은 민감도 및 특이도로 인하여 담도 폐쇄증의 진단에 사용할 수 없다<sup>31)</sup>.

간담도 스캔은 담도 폐쇄증을 진단하는데 있어 민감도(100%)는 높으나 특이도(75%)가 너무 낮은 특징을 보인다<sup>32)</sup>. 즉 저담즙변 혹은 무담즙변을 보이는 담즙정체 환자에서 장관 내 조영제 배출이 보이는 경우에는 담도 폐쇄증을 배제할 수 있으나 24 시간 후 장관내에 조영제 배출이 보이지 않는 경우에도 담도 폐쇄증을 배제할 수 없다는 점이 문제이며 신생아 간염이나 TPN 관련 담즙정체가 심하여 무담즙변에 가까울수록 장관내 조영제 배출이 보이지 않게 되므로 감별 진단에 도움이 되지 않는 검사이다. <sup>99m</sup>Tc-DISIDA scan은 위양성이 흔한 단점뿐 아니라 폐노바르비탈(5 mg/kg/day×5일) 투여 등으로 인해 검사가 지연되는 것도 문제이다.

MR 담관조영술에서 완전하게 간의 담도가 보이

는 경우에는 담도 폐쇄증을 배제할 수 있다<sup>33)</sup>. MR 담관조영술에서 담도계가 보여지기 위해서는 담즙의 생산과 배출이 충분하여야 하는데 심한 담즙정체성 질환에서 담즙의 생산과 배출이 불충분할 경우 담도가 보이지 않을 수 있다. 또한 얇은 호흡을 하는 신생아에서 MR 담관조영술로 비정상적으로 확장된 담도를 보여줄 수는 있으나 호흡을 참지 못하기 때문에 정상 담도의 영상이 깨어지기 쉬워 담도가 폐쇄된 것을 확인하기 어렵다. MR 담관조영술이 담도계를 명백히 보여주어 담도 폐쇄증을 배제하는데 매우 믿을만한 비침습적 영상진단법이라고 보고되었으나 Norton 등<sup>34)</sup>은 MR 담관조영술에서도 위양성 및 위음성이 생기고 전체적인 정확도가 82%에 그친다고 보고하기도 했다. MR 영상에서도 담도 폐쇄증 환아에서 문맥주위 섬유화와 관련된 것으로 보이는 문맥주위 비후를 보여줄 수 있다. 그러나 문맥주위 섬유화는 담도 폐쇄증에 특이하지 않으며 심한 신생아 간염과 같은 다른 질환에서도 나타날 수 있다. 최근 염과 최 등<sup>35)</sup>은 담도로 배출되는 간 특이 조영제인 Mangafodipir trisodium (Mn-DPDP)을 이용한 조영 증강 MR 담관조영술을 담즙정체성 간질환 환아들에게 실시하여 위양성 없이 담도 폐쇄증의 조기 진단이 실질적으로 가능함을 확인하였다. 조영제 주사 후 적어도 1시간체에 Mn-DPDP의 십이지장 배출이 보이거나 담낭과 간의 담도가 명확히 나타나는 경우에는 담도 폐쇄증을 배제할 수 있을 것으로 보인다.

간조직 검사는 담도 폐쇄증의 진단에 유용하며 정확도가 90% 이상이라고 여겨지나 병리와 의사의 경험에 따른 편차가 역시 존재한다<sup>36)</sup>. 광범위한 담세관 증식이 특징적인 소견이지만 담도 폐쇄증에 특이적이지 못하고 비폐쇄성 질환(중증의 신생아 간염 특히 CMV 감염, 초기 Alagille 증후군, 총 담관 영양, 폐혈증 등)에서도 어느 정도 보일 수 있다는 점이 확진을 어렵게 하며 또한 특징적인 조직 소견은 생후 9주 이후에야 나타날 수 있다는 점이 조기 진단의 장애물이 되기도 한다. 그러므로 간조직의 분자유전학적 분석이 보다 더 정확한 진단에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각한다.

간 손상과 관련된 유전자들을 밝히려는 노력들로 connective tissue growth factor (CTGF), IL-8과 같은 특정 유전자들의 mRNA의 발현을 연구하였으나<sup>37,38)</sup> northern blot이나 RT-PCR과 같은 방법 등은 많은 노력에 비해 소수의 유전자만을 분석할 수 있는 점이 한계라고 하겠다. 최근 많이 이용되고 있는 유전자 분석법들을 보면 expressed sequence tag (EST) sequencing, cDNA microarray hybridization, subtractive cloning, differential display, serial analysis of gene expression (SAGE) 등이 있으며 이들의 특징은 한 번의 실험으로 동시에 다수의 변형 유전자들의 발현을 분석할 수 있다는 점이다<sup>39)</sup>. 간조직의 유전자 연구에 있어서도 간 손상의 병리과정인 염증반응, 증식, 소멸, 섬유화 등은 서로 연관되어 있고 각 과정에서 증가된 많은 유전자들의 발현의 차이를 동시에 볼 수 있는 연구들이 진행 중이다. 국내에서도 이러한 방법 중 하나인 EST 정보를 이용하는 differential EST screening (DES) 방법을 이용하여 정상 간조직보다 담도 폐쇄증의 간경변 조직에서 발현이 증가된 26클론과 발현이 감소된 2클론을 보고한 적이 있으나 유전자의 발현 양상을 전체적으로 보여주기에는 어려웠고 감별 진단을 해야 하는 시점에서는 RNA를 충분히 확보하지 못하여 조기 진단 목적으로 결과를 응용하기 어렵다고 생각한다<sup>40)</sup>. 그러나 본 연구에서는 작은 조직의 소량의 RNA를 가지고서도 동시에 많은 유전자 발현을 분석할 수 있어 생후 1~2개월에 시행한 간생검 조직으로도 감별 진단 목적으로 유전자 비교가 가능하였다는 점에서 의미를 둘 수 있다. 또한 민감도가 높은 cDNA microarray 분석을 이용하여 담도 폐쇄증의 간조직에서 발현의 차이를 보이는 유전자들을 분석할 수 있었고 더불어 전체적인 유전자 발현 양상을 신생아 간염 증후군과 비교 가능하였다.

본 연구의 컴퓨터 분석에 의한 유전자 발현 양상을 세분해보면 담도 폐쇄증에서는 조직 소견과 유전자 발현 양상이 꼭 일치하지는 않으나 모두 비슷한 양상을 보였고, 신생아 간염 증후군에서는 세 군으로 나뉘었다. NH1과 NH2는 조직 소견상 염증도 적고, 섬유화도 경미하였으며 황달도 진단 2~3주

내에 호전을 보여 임상 양상이 비교적 가벼운 경과를 보인 경우로 유전자 발현 양상도 담도 폐쇄증과 현저한 차이를 보였다. 유전자 발현 양상이 담도 폐쇄증에 비슷하게 나온 NH3는 임상 양상과 간조직 소견상 담도 폐쇄증과 감별이 어려웠던 환자 였는데, MR 담관조영술을 이용하여 담도 폐쇄증을 배제할 수 있었기에 개복 진단을 하지 않았지만 황달의 호전에 2개월이 소요되었던 경우로 신생아 간염이 담도 폐쇄증으로 진행할 수 있었던 경우가 아니었을까 추정한다. 나머지 한명 NH4는 임상적으로 신생아 간염으로 고려되어 관찰 중 장기간 호전이 없어 생후 10개월경에 간조직 검사를 시행한 경우로 다른 환자들과 달리 조직 검사 시 월령이 많아 비교는 곤란하지만, 신생아 간염 증후군과 담도 폐쇄증의 중간 정도의 유전자 발현을 보여 신생아 간염도 장기간 지속 시 담도 폐쇄증과 비슷한 유전자 발현 양상을 보일 수 있을 것으로 보인다. 이들 집단간의 임상 증상과 조직학적 소견을 비교해보면, 염증과 섬유화의 정도가 심할수록 담도 폐쇄증에 가까운 발현을 보이고 있으나 간손상의 진행 정도에 따라 유전자들의 발현이 차이가 있음을 알 수 있었다. 이러한 소견은 담도 폐쇄증의 병인론에서도 논의되고 있는 대로 신생아 간염 등 다른 질환에서도 섬유화와 담도 손상이 진행시 담도 폐쇄증의 유전자 양상으로 표현될 수 있음을 유추해 볼 수 있었다<sup>41)</sup>.

위와 같이 염증과 섬유화의 진행 정도에 따라 유전자들의 발현에 차이를 보이므로 간조직을 얻는 시점이 중요할 것으로 생각된다. 이전의 담도 폐쇄증에서의 보고들은 간조직 생검 시점이 주로 간이 식시에 얻어진 즉 간경변이 많이 진행된 상태였기 때문에 담도 폐쇄증의 경우에는 간섬유화에 관련된 유전자들이 주로 발현될 수밖에 없었다<sup>8,9,40)</sup>. 그러나 본 연구는 대부분 생후 2개월 전후로 간경변이 심하지 않은 시점에서 실험이 진행되었기 때문에 담도 폐쇄증과 신생아 간염간의 초기 유전자형을 비교할 수 있었다. 담도 폐쇄증 환자에서 lysyl oxidase-like 3, TGF- $\beta$ 1, collagen같은 섬유화에 관여하는 유전자들이 신생아 간염에 비하여 증가가 관찰되었으나, 과거의 보고에서와 같이 현저하지는 않았다. 또한

세포 유지와 transcription 등에 관여하는 유전자가 상대적으로 감소되어 있었다는 점을 담도 폐쇄증의 병인에 비추어 볼 때 의미를 둘 수 있는 발견이라고 생각한다.

유전자 발현 microarray 분석은 개개 유전자 발현을 정량화 하기보다는 발현에 변동을 보이는 유전자를 밝히는 것으로 질환과 관련된 적절한 세포만을 선택하는 것이 중요하다. 이는 전체 조직을 사용할 경우 정상 간질 조직이나 염증 세포들이 포함되어 있어 결과의 해석에 혼란을 초래할 수 있기 때문이다. 전체조직을 사용하는 장점으로 세포 선택의 편견이 적고, 다양한 개개의 세포들이 보이는 분자적 조직망을 유지할 수 있고, 소수 또는 선택되지 않은 세포들에 의해 생성되는 신호를 인지할 수 있으며, 실험의 재현이 가능한 점을 들 수 있으나, 이러한 연구의 평가를 높이기 위해서는 세포 소단위별 mRNA 분석이 필요할 것으로 생각한다. 특정세포만을 추출하는 방법에는 유세포 분석기를 이용하는 방법과 microdissection 방법이 있는데, 최근 개발된 laser capture microdissection법이 정확도가 높고 양질의 RNA를 추출할 수 있는 것으로 알려져 있다<sup>42,43</sup>. 본 실험에서는 담도 상피세포만을 분리하지 않고 간조직 전체를 실험에 이용하였으나 담도 폐쇄증에 특이적으로 발현되는 유전자를 검출하기 위해서는 담도 상피세포 분리에 대한 연구가 더 있어야 할 것으로 고려된다.

본 연구는 생후 2개월 전후의 담즙정체를 보이는 환자들의 간조직에서 유전자 발현 양상을 보여 줌으로써 담도 폐쇄증의 조기 진단에 도움을 줄 것으로 생각한다. 이 실험은 담도 폐쇄증과 신생아 간염 증후군 환자에서만 비교 연구가 진행되었으나, 신생아 담즙정체를 일으키는 여러 다른 질환과의 비교 연구가 이루어진다면 담도 폐쇄증을 포함한 신생아 담즙정체 질환에 대한 병태 생리와 진단 및 치료에 도움을 줄 수 있는 유전 정보를 얻을 수 있을 것으로 생각하며 나아가 간경변의 치료와 예방 물질의 개발을 위한 기초 자료로도 활용될 수 있을 것으로 생각한다.

또한 본 연구에서 밝혀진 유전자를 더 많은 담도

폐쇄증 환자와 신생아 간염 환자의 생검 조직을 확보하여, 질환의 진행 시기에 따른 유전자 발현의 차이를 RT-PCR 등으로 확인할 수 있다면 두 질환간의 감별을 할 수 있는 novel gene을 찾을 수도 있을 것으로 생각한다.

## 요 약

**목 적:** 담즙정체를 보이는 환자의 간조직에서 cDNA microarray를 이용한 유전자 발현 분석을 통하여 담도 폐쇄증의 발생과정에 관여하는 유전자를 규명하고자 연구를 시행하였다.

**방 법:** 환자의 간조직은 담즙정체를 보이는 11명의 환자로부터 진단적 간생검시 얻은 간조직의 일부를 이용하였다. 이들의 원인 질환은 담도 폐쇄증이 7명, 신생아 간염 증후군이 4명이었다. 정상대조군의 간조직은 생체부분 간이식시 성인 공여자로부터 얻은 간조직의 일부를 이용하였다. 간조직에서 분리된 mRNA를 4.7K 인간유전자 cDNA microarray를 이용하여 유전자 발현의 양상을 분석하였다.

**결 과:** 분석한 4,700종의 유전자 중 담즙정체 환자 11명 모두의 간조직에서 발현이 증가된 유전자는 17종이 발견되었고, 발현이 감소된 유전자는 20종이 발견되었다. 담도 폐쇄증 환자와 신생아 간염 증후군 환자 사이에 49종의 유전자에서 발현의 차이가 관찰되었고, 특히 담도 폐쇄증에서는 발현이 증가하였으나 신생아 간염 증후군에서는 발현이 감소된 유전자는 24종이었으며 이들 유전자 발현의 차이에 의해서 두 군간의 감별이 가능하였다.

**결 론:** 신생아 간질환에서 담도 폐쇄증 환자들은 모두 일정한 양상을 보여주어 이에 대한 분석을 통하여 담도 폐쇄증의 조기 감별 진단을 할 수 있을 것을 시사하였다. 또한 담도 폐쇄증에서 특이 발현을 보이는 유전자의 추가적인 기능 연구를 시행함으로써 담도 폐쇄증의 원인을 규명하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 생각한다.

## 참 고 문 헌

- 1) Balistreri WF, Heubi JE, Suchy FJ. Immaturity of the enterohepatic circulation in early life: factors predisposing to "physiologic" maldigestion and cholestasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1983;2:346-54.
- 2) 김경모, 서정기. 신생아 담즙정체증의 원인질환 및 장기추적 예후인자에 관한 고찰. *대한소아소화기영양학회지* 1999;2:46-58.
- 3) Sokol RJ, Mack C, Narkewicz MR, Karrer FM. Pathogenesis and outcome of biliary atresia: current concepts. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003;37:4-21.
- 4) Schreiber RA, Kleinman RE. Biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;35:S11-6.
- 5) Rosenthal P. Neonatal hepatitis and congenital infections. In: Suchy FJ, Sokol RJ, Balistreri WF, editors. *Liver disease in children* 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins press; 2001:239-52.
- 6) Bates MD, Bucuvalas JC, Alonso MH, Ryckman FC. Biliary atresia: pathogenesis and treatment. *Semin Liver Dis* 1998;18:281-93.
- 7) Zhang DY, Sabla G, Shivakumar P, Tiao G, Sokol RJ, Mack C, et al. Coordinate expression of regulatory genes differentiates embryonic and perinatal forms of biliary atresia. *Hepatology* 2004;39:954-62.
- 8) Chen L, Goryachev A, Sun J, Kim P, Zhang H, Phillips MJ, et al. Altered expression of genes involved in hepatic morphogenesis and fibrogenesis are identified by cDNA microarray analysis in biliary atresia. *Hepatology* 2003;38:567-76.
- 9) Bezerra JA, Tiao G, Ryckman FC, Alonso M, Sabla GE, Shneider B, et al. Genetic induction of pro-inflammatory immunity in children with biliary atresia. *Lancet* 2002;360:1653-9.
- 10) Lee BS, Chuang JH, Huang CC, Chou MH, Wu CL, Chen CM, et al. Identification of transforming growth factors actively transcribed during the progress of liver fibrosis in biliary atresia. *J Pediatr Surg* 2004;39:702-8.
- 11) Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarray. *Nat Genet* 1999;21:S10-4.
- 12) Leung YF, Cavalieri D. Fundamentals of cDNA microarray data analysis. *Trends Genet* 2003;19:649-59.
- 13) Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, Groote JD, Gudat F, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995;22:696-9.
- 14) DeRisi JL, Penland PO, Brown ML, Bittner PS, Meltzer M, Ray Y, et al. Use of cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* 1996;14:457-60.
- 15) 김경모, 이승규, 이영주, 박광민, 김성철, 전훈배 등. 소아에서 생체부분간이식의 적응증과 예후. *소아과* 1998;41:622-31.
- 16) Ryckman FC, Alonso MH, Bucuvalas JC, Balistreri WF. Biliary atresia-surgical management and treatment options as they relate to outcome. *Liver Transplant Surg* 1998;4Suppl:24-33.
- 17) OtteJ-B, de Ville de Goyet J, Reding R, Hausleithner V, Sokal E, Chardot C, et al. Sequential treatment of biliary atresia with Kasai portoenterostomy and liver transplantation: a review. *Hepatology* 1994;20:41S-8S
- 18) Chardot C, Carton M, Spire-Bendelac N, Le Pommélet C, Golmard J, Reding R, et al. Is the Kasai operation still indicated in children older than 3 months diagnosed with biliary atresia? *J Pediatr* 2001;138:224-8.
- 19) Balistreri WF, Grand R, Hoofnagle JH, Suchy FJ, Ryckman FC, Perlmutter DH, et al. Biliary atresia: current concepts and research directions. Summary of a symposium. *Hepatology* 1996;23:1682-92.
- 20) Perlmutter DH, Shepherd RW. Extrahepatic biliary atresia: a disease or a phenotype? *Hepatology* 2002;35:1297-304.
- 21) Tyler KL, Sokol RJ, Oberhaus SM, Le M, Karrer FM, Narkewicz MR, et al. Detection of reovirus RNA in hepatobiliary tissues from patients with extrahepatic biliary atresia and choledochal cysts. *Hepatology* 1998;27:1475-82.
- 22) Riepenhoff-Talty M, Gouvea V, Evans MJ, Svensson L, Hoffenberg E, Sokol RJ, et al. Detection of group C rotavirus in infants with extrahepatic biliary atresia. *J Infect Dis* 1996;174:8-15.
- 23) Domiati-Saad R, Dawson DB, Margraf LR, Finegold MJ, Weinberg AG, Rogers BB. Cytomegalovirus and human herpesvirus 6, but not human papillomavirus, are present in neonatal giant cell hepatitis and extrahepatic biliary atresia. *Pediatr Dev Pathol* 2000;3:367-73.
- 24) Drut R, Drut RM, Gomez MA, Cueto Rua E, Lojo MM. Presence of human papillomavirus in extra-

- hepatic biliary atresia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998;27:530-5.
- 25) Ahmed AF, Nio M, Ohtani H, Nagura H, Ohi R. In situ CD14 expression in biliary atresia: comparison between early and late stages. *J Pediatr Surg* 2001; 36:240-3.
  - 26) Mack CL, Tucker RM, Sokol RJ, Karrer FM, Kotzin BL, Whittington PF, et al. Biliary atresia is associated with CD4<sup>+</sup> Th1 cell-mediated portal tract inflammation. *Pediatr Res* 2004;56:79-87.
  - 27) Davenport M, Gonde C, Redkar R, Koukoulis G, Tredger M, Mieli-Vergani G, et al. Immunohistochemistry of the liver and biliary tree in extrahepatic biliary atresia. *J Pediatr Surg* 2001;36:1017-25.
  - 28) Kobayashi H, Puri P, O'Briain DS, Surana R, Miyano T. Hepatic overexpression of MHC class II antigens and macrophage-associated antigens (CD68) in patients with biliary atresia of poor prognosis. *J Pediatr Surg* 1997;32:590-3.
  - 29) Hernandez HM, Kovarik P, Whittington PF, Alonso EM. Autoimmune hepatitis as a late complication of liver transplantation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001;32:131-6.
  - 30) Park WH, Choi SO, Lee HJ. The ultrasonographic 'triangular cord' coupled with gallbladder images in the diagnostic prediction of biliary atresia from infantile intrahepatic cholestasis. *J Pediatr Surg* 1999; 34:1706-10.
  - 31) Kanegawa K, Akasaka Y, Kitamura E, Nishiyama S, Muraji T, Nishiyama E, et al. Sonographic diagnosis of biliary atresia in pediatric patients using the "triangular cord" sign versus gallbladder length and contraction. *AJR Am J Roentgenol* 2003;181:1387-90.
  - 32) Kaminska A, Pawlowska J, Jankowska I, Swiatek-Rawa E, Socha P, Kaminski A, et al. Hepatobiliary scanning in the diagnosis of biliary atresia. *Med Sci Monit* 2001;7(Suppl 1):110-3.
  - 33) Guibaud L, Lachaud A, Touraine R, Guibai AL, Pelizzari M, Basset T, et al. MR cholangiography in neonates and infants: feasibility and preliminary applications. *AJR Am J Roentgenol* 1998;170:27-31.
  - 34) Norton KI, Glass RB, Kogan D, Lee JS, Emre S, Shneider BL. MR cholangiography in the evaluation of neonatal cholestasis: initial results. *Radiology* 2002;222:687-91.
  - 35) Ryeom HK, Choe BH, Kim JY, Kwon SH, Ko CW, Kim HM, et al. Biliary atresia: feasibility of mangafodipir trisodium-enhanced MR cholangiography for evaluation. *Radiology* 2005;235:250-8.
  - 36) Zerbini MC, Gallucci SD, Maezono R, Ueno CM, Porta G, Maksoud JG, et al. Liver biopsy in neonatal cholestasis: a review on statistical grounds. *Mod Pathol* 1997;10:793-9.
  - 37) Paradis V, Dargere D, Vidaud M, De Gouville AC, Huet S, Martinez V, et al. Expression of connective tissue growth factor in experimental rat and human liver fibrosis. *Hepatology* 1999;30:968-76.
  - 38) Napoli J, Bishop GA, McCaughan GW. Increased intrahepatic messenger RNA expression of interleukins 2, 6, and 8 in human cirrhosis. *Gastroenterology* 1994;107:789-98.
  - 39) Carulli JP, Artinger M, Swain PM, Root CD, Chee L, Tulig C, et al. High throughput analysis of differential gene expression. *J Cell Biochem* 1998;Suppl 30/31:286-96.
  - 40) Choe BH, Kim KM, Kwon SH, Lee KS, Koo JH, Lee HM, et al. The pattern of differentially expressed genes in biliary atresia. *J Korean Med Sci* 2003;18: 392-6.
  - 41) Mack C, Sokol RJ. Unraveling the pathogenesis and etiology of biliary atresia. *Pediatr Res* 2005;57:87R-94R.
  - 42) Sugiyama Y, Sugiyama K, Hirai Y, Akyama F, Hasumi K. Microdissection is essential for gene expression profiling of clinically resected cancer tissues. *Am J Clin Pathol* 2002;117:109-16.
  - 43) Fend F, Raffeld M. Laser capture microdissection in pathology. *J Clin Pathol* 2000;53:666-72.