

N-nitrosoethylurea가 쥐 간세포의 항산화효소의 활성화에 미치는 영향

이 미 영*

순천향대학교 생명과학부

Effects of N-nitrosoethylurea on the Activities of Antioxidant Enzymes from Rat Liver Cell

Mi Young Lee*

Department of Life Science, College of Natural Science, Soonchunhyang University,
Asan PO Box 97, 336-600, Korea

Abstract - N-nitrosoethylurea (NEU)-induced changes of lipid peroxide content, aldehyde metabolic enzyme activities and antioxidant enzyme activities were examined in cultured rat liver cell. Aldehyde metabolic enzymes tested in this investigation were alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase. Several antioxidant enzymes tested were glutathione transferase, superoxide dismutase, glutathione reductase and catalase. When the cell was exposed with various concentrations of NEU, lipid peroxide content increased about 2.5 fold with 6.25 mM NEU. Maximum 2.3 times higher alcohol dehydrogenase activity was found after NEU treatment. About 2 times higher aldehyde dehydrogenase activity could also be observed. Only slight increases of glutathione transferase and catalase activities occurred with NEU treatment. In addition maximum 1.5 times higher superoxide dismutase activities and 3 times higher glutathione reductase activities were found after NEU treatment. Therefore, it is likely that the increases of superoxide dismutase and glutathione reductase could contribute in a antioxidative process against NEU toxicity.

Key words : N-nitrosoethylurea, rat liver cell, antioxidant enzymes

서 론

N-nitrosoethylurea와 N-nitrosomorpholine 등의 니트로조 화합물은 발포잉크와 염료의 성분일 뿐만 아니라 생활환경에서 다양하게 접할 수 있게 되는 발암물질이다(Hasegawa *et al.* 1998). 체내에서는 헴과 소세지의 발색제 성분인 아질산나트륨이 단백질과 결합하여 니트

로조아민 등의 니트로조 화합물을 생성하게 된다. 니트로조 화합물이 세포내로 흡수되게 되면 산화스트레스를 유도하거나 발암화 과정을 촉진시킨다(Faber 1984). N-nitrosoethylurea (NEU)는 반감기가 약 20분으로서 NEU에 의한 세포독성 및 발암화 과정은 x-선 조사(Seyama *et al.* 1985)와 para-aminobenzoic acid (Malashenko and Vasileva 1985)에 의하여 공동상승적으로 증가되었다. 뿐만 아니라 쥐의 발암화과정은 명/암 조건에 의하여 변화하였는데, 명조건에서의 발암화는 암조건에서의 발암화보다 빠른 속도로 진행되었다 (Beniashvili *et al.*

* Corresponding author: Mi Young Lee, Tel. 041-530-1355, Fax. 041-530-1355, E-mail. miyoung@sch.ac.kr

2001). N-nitrosoethylurea가 메틸화되게 되면 쥐의 K-ras 유전자의 12번 코돈에 point mutation이 일어난다고 보고되기도 했다(Ohgaki *et al.* 1991). NEU 처리된 C3H/HeNcr 쥐에서는 transmembrane domain의 missense point mutation에 의해 neu oncogene이 활성화된다고 보고되었다(Buzard *et al.* 1999). Benzopyrene과 3-methylcholanthrene에 의한 발암화의 강력한 억제제로 알려진 beta-naphthoflavone은 N-nitrosoethylurea에 의한 발암화를 억제하지는 못하는 것으로 보고되었다(Anderson *et al.* 1990). 따라서 발암원의 종류에 따라 서로 다른 발암화 과정이 진행될 것으로 예측하고 있다.

NEU를 포함한 이물질(Xenobiotics)의 세포내 대사과정을 살펴보면 이물질 유입후 우선 phase I 효소와 phase II 효소가 활성화되게 된다. Phase I 효소에 의해서 이물질의 산화-환원반응이 일어나게 되며, 이 과정에서 생성된 중간체들은 phase II 효소에 의해 복합체를 형성하여 배설된다(Nebert *et al.* 1987). 이때 산소의 부분적인 환원으로 hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide anion (O_2^-), hydroxyl radical ($OH \cdot$)과 같은 활성산소종이 생성되어 지질 과산화반응을 통한 지질의 자동산화를 촉진시킬 수 있게 된다. 활성산소종은 세포막을 구성하고 있는 불포화 지질성분의 이중결합과 작용하여 연쇄적인 반응을 통하여 지질 과산화물을 형성하고(Mitchell and Petersen 1987), 이들 물질은 세포내의 여러 기관에 독성을 유발한다. 뿐만 아니라 4-hydroxynonenal 등의 지질 과산화반응 산물인 각종 aldehyde가 생성되게 되므로(Eckl and Esterbauer 1989), aldehyde 대사에 관련된 효소의 활성이 증가된다고 보고되어 왔다(Feinstein and Cameron 1972; Canuto *et al.* 2001). 활성산소종의 양을 조절할 수 있는 항산화효소로는 glutathione peroxidase, glutathione transferase, superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase 등을 들 수 있다. 항산화효소들은 주로 환원제를 기질로 사용하여 활성산소에 전자를 줌으로써 항산화반응을 촉매하는데 이 중 glutathione transferase는 Se-비의존적 peroxidase활성을 지니고 있어 지질 과산화물 제거반응에 관여할 뿐만 아니라 세포의 전암성 병변의 표지효소로도 알려져 있다(Farber 1984; Rushmore and Faber 1987). Phase I 효소와 phase II 효소에 의한 이물질 대사과정을 설명하기 위한 모델로는 Ah 유전자 전지 모델(Ah gene battery)을 들 수 있다. 이 모델에 의하면 Ah 유전자전지를 구성하고 있는 유전자로는 CYP1A1, CYP1A2, Class III aldehyde dehydrogenase, glutathione transferase 유전자 등이 있다(Marselos and Michalopoulos 1987; Nebert *et al.* 1990; Sophos *et al.* 2001).

본 실험에서는 N-nitrosoethylurea에 의해 유발되는 세포독성과 발암화 과정을 이해하기 위한 기초연구로서 다양한 농도의 N-nitrosoethylurea를 쥐 간세포(clone 9)에 처리하였다. N-nitrosoethylurea에 의해 증가한 지질 과산화물의 함량을 측정하고 aldehyde 대사 관련 효소와 항산화효소의 활성변화를 분광광도법과 전기영동상에서의 활성염색을 통하여 서로 비교하였다.

재료 및 방법

1. 세포주

본 연구에 사용한 쥐 간세포인 clone 9 세포주는 한국 세포주 은행으로부터 분양 받았다. Clone 9은 10% FBS가 첨가된 Ham's F12K배지를 사용하여 5% CO_2 , 95% air, 37°C의 CO_2 배양기에서 배양하였다(Kim *et al.* 1999).

2. 세포주의 계대배양

액체 질소에 보관되어 있는 동결세포를 37°C 수조에 서 녹인 후 10 ml의 배지와 혼합하여 4°C, 500 g에서 5분간 원심분리 후 상등액을 제거하고 5 ml의 배지에 잘 현탁한 후 25 cm² 세포 배양 플라스크에 옮겨 5% CO_2 , 37°C의 CO_2 배양기에서 배양하였다. 세포의 계대배양은 각각의 배지에 10% FBS를 첨가한 배지를 사용하였다. 배양액을 모아 4°C, 500 g에서 5분간 원심 분리한 후 상등액을 제거하고, 5 ml의 새로운 배지에 현탁하여 세포 배양 플라스크로 분주하였다. 그 외의 세포의 경우 배양액을 흡입 제거한 후 1 ml의 trypsin-EDTA 용액을 가하여 5% CO_2 , 37°C의 CO_2 배양기에서 약 3분간 반응시킨 후 trypsin-EDTA 용액에 의해 부유된 세포들을 원심분리용 튜브로 옮기고, 4°C, 500 g에서 5분간 원심 분리한 후 상등액을 다시 제거 후 5 ml의 새로운 배지에 수확된 세포를 현탁하여 세포배양 플라스크에 분주하고, 5% CO_2 , 37°C의 CO_2 배양기에서 배양하였다.

3. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay

MTT 용액은 배지에 5 mg ml⁻¹의 MTT를 용해 후 살균된 여과지로 여과하여 불용성 물질을 제거하여 사용하였다. 세포수를 10⁴ ml⁻¹로 희석하여 200 µl씩 분주한 뒤 5% CO_2 , 37°C의 CO_2 배양기에서 24시간 배양하였다. 그 후 발암물질을 농도별로 첨가하여 24시간 더 배양한 뒤 조제한 MTT solution을 20 µl well⁻¹씩 첨가하여 4시간 더 반응시키고 배지를 흡입 제거하였다. DMSO를 50

$\mu\text{l well}^{-1}$ 씩 가하고 잘 교반하여 침전물을 완전히 용해하였다. 각 well의 흡광도는 ELISA reader를 이용하여 각 well의 570 nm에서의 흡광도를 측정하였고 background wavelength는 630 nm에서 측정하였다(Kim *et al.* 1999).

4. N-nitrosoethylurea의 처리

Clone 9 세포주에 대한 N-nitrosoethylurea (NEU)의 처리농도는 0, 0.39, 1.56, 6.25 mM 로 결정하였다. NEU를 배지에 처리하여 24시간이 지난 후 새 배지로 갈아준 후 세포가 플라스크바닥에 80% 이상 차지할 때까지 배양하였다.

5. 효소원의 분리

비부착성 세포의 경우 배양액을 모아 4°C, 500 g에서 5분간 원심 분리하여 세포를 모은 후 PBS로 3번 수세 후 균질화 하였으며, 부착성 세포의 경우는 trypsin-EDTA로 처리하여 바닥으로부터 세포를 떼어 낸 후 원심분리용 튜브에 모아 4°C, 500 g에서 5분간 원심분리 후 PBS로 3회 수세하였고 1 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoethanol을 포함한 0.1 M tris-HCl (pH 7.4) 완충용액 1 ml을 첨가하여 세포를 부유시킨 후 균질화하였다. 균질화된 세포 혼합액을 10,000 g에서 1시간 동안 원심분리하여 상층액을 취해 효소액으로 사용하였다(Tsao *et al.* 1985).

6. 효소의 활성측정 및 활성염색

Alcohol dehydrogenase와 aldehyde dehydrogenase, glutathione transferase, glutathione reductase, catalase 및 superoxide dismutase 반응은 상온에서 반응 혼합액에 각각 효소액을 가하여 시작하였으며(Canuto *et al.* 1993), 효소 1 unit은 위의 반응 조건에서 1분 동안에 1 μmole 의 기질을 생성물로 변화시키는데 필요한 효소의 양으로 정하였고, 비활성도(specific activity)는 단백질 1 mg당의 효소활성(unit)으로 나타냈다. 전기영동은 6% polyacrylamide gel을 이용하여 10 μg 의 시료를 주입하여 효소원을 전개한 후 각각 활성염색하였다.

7. 지질 과산화물 함량 측정

지질 과산화물 함량은 thiobarbituric acid (TBA) 방법을 이용하여 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 함량을 측정하였고(Kim *et al.* 1999) 1% sulfuric acid를 용매로 한 10 mM TMP를 표준용액으로 사용하였다.

결과 및 고찰

N-nitrosoethylurea 등의 발암성 니트로조 화합물은 genotoxic carcinogen으로 dimethylnitrosamine, 2-acetylaminofluorene, aflatoxin B₁ 등과 비슷한 방법으로 세포내에서 친전자체로 대사된다고 알려져 있다(Lindahl 1977). 최근 발암성 니트로화합물은 매우 효과적인 발암개시원(initiator)으로 작용한다고 보고되었으며(Brown-Peterson *et al.* 1999), 이미 발암개시된 세포에서 더 이상 발암촉진작용을 하지는 않을 것으로 생각되고 있다(Hasegawa *et al.* 1998). 발암성 니트로화합물은 세포내에서 산화스트레스를 유발하게 되고 지질 과산화반응을 촉진함으로써 지질 과산화반응의 중간산물인 aldehyde의 생성을 유도하게 된다. 따라서 암화과정이 진행되면서 aldehyde대사를 수행하는 aldehyde dehydrogenase, aldehyde reductase와 alcohol dehydrogenase의 활성변화가 일어나게 된다고 알려져 있다. 특히 preneoplastic cell에서 neoplastic cell로의 형질전환의 표지인자로 aldehyde dehydrogenase의 활성증가를 이용하기도 한다(Canuto *et al.* 1993; Hempel *et al.* 2001; Muzio *et al.* 2001). Aldehyde dehydrogenase (ALDH)의 활성증가는 정상세포에서는 발현되지 않는 tumor-specific class III ALDH 유전자의 발현에 기인한다고 보고되었다(Canuto *et al.* 2001; Wymore *et al.* 2001). 니트로조화합물에 의하여 발암개시된 간세포에 내분비교란물질인 di-(2-ethylhexyl)phthalate을 처리하면 class III ALDH와 p21 Ras 단백질이 발현된다고 보고된 바 있다(Richmond *et al.* 1996). Alcohol dehydrogenase (ADH)는 각종 aliphatic aldehyde와 aromatic aldehyde를 alcohol로 전환시킬 수 있는 효소로서 특히 간 발암화 과정에서 ADH의 활성이 증가하였다(Canuto *et al.* 1993). 따라서 aldehyde 대사에 관련된 효소의 활성증가는 발암물질로 인해 생성된 aldehyde 뿐만 아니라 지질과산화반응에 의해 생성된 aldehyde에 대해 세포를 방어하기 위한 기작과도 관련이 있다(Lindahl 1992). 뿐만 아니라 산화스트레스에 대한 세포의 방어기작의 일부분으로 파악할 수도 있다.

Table 1에서는 다양한 농도의 N-nitrosoethylurea가 clone 9세포의 ADH와 ALDH의 활성에 미치는 영향을 조사하였다. N-nitrosoethylurea의 농도를 0.39 mM에서 6.25 mM로 증가시키면서 ADH의 비활성도를 측정한 결과 0.39 mM의 N-nitrosoethylurea에 의하여 ADH의 비활성도가 대조군에 비하여 약 2.3배 증가하였다. 0.39 mM 이상의 농도에서는 처리농도가 증가함에 따라

Table 1. Effects of N-nitrosoethylurea on the activities of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase from rat liver cell

Carcinogen	Concentration (mM)	ADH*	ALDH*
	0	100	100
N-nitrosoethylurea	0.39	230±2.8	150±2.1
	1.56	170±2.9	200±1.2
	6.25	90±2.2	175±3.2

ADH*: Alcohol dehydrogenase

ALDH*: Aldehyde dehydrogenase

Table 2. Effect of N-nitrosoethylurea on the lipid peroxide levels in terms of thiobarbituric acid reactive substance content

Carcinogen	Concentration (mM)	Lipid peroxide level (%)
	0	100
N-nitrosoethylurea	0.39	150±2.4
	1.56	152±1.9
	6.25	250±2.7

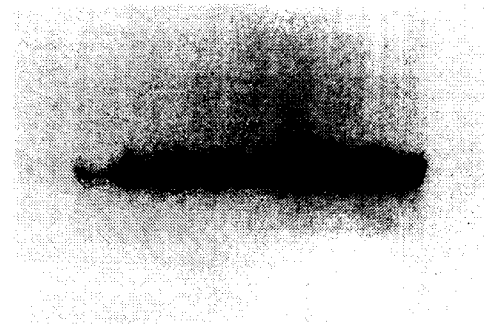
ADH의 비활성도가 감소하는 경향을 나타냈으나 전반적으로 높은 비활성도를 유지하였다. 유사한 니트로조화합물인 N-nitrosodiethylamine 처리에 의하여도 ADH의 활성이 현격하게 증가한다고 보고된 바 있다(Kim *et al.* 1999). NEU 처리에 의한 ALDH의 활성변화를 살펴보면 0.39 mM에서 6.25 mM의 전 농도구간에서 비활성도의 증가를 보였다. 특히 1.56 mM의 N-nitrosoethylurea에 의하여 ALDH 비활성도가 약 2배 증가하였다. 이러한 결과는 발암물질처리로 인해 생성된 세포내 aldehyde를 무독화 시키기 위한 대사과정일 뿐만 아니라 일종의 방어기작으로 이해할 수 있다. Fig. 1과 Fig. 2에서는 N-nitrosoethylurea의 농도증가에 따른 ADH와 ALDH의 활성변화를 자가 전기영동상에서의 활성염색을 통하여 살펴보았다. 비활성도의 증가와 함께 NEU의 농도 증가에 따른 ADH와 ALDH 활성변화를 활성띠의 강도변화를 통하여 확인할 수 있었다.

발암원에 의하여 정상세포가 암세포로 형질전환되는 과정에서도 활성산소종이 생성된다. 세포내의 주요한 활성산소종으로는 superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, singlet oxygen 등이 있다. 고농도의 활성산소종은 화학적 반응성과 산화력이 강력하여 단백질과 DNA 및 세포내 다양한 부위에 심각한 손상을 주게 된다. 이로 인하여 지질 과산화반응이 촉진되면 세포는 산화스트레스에 놓이게 된다. 따라서 지질과산화 반응은 세포의 산화스트레스의 척도로 널리 사용되고 있다. 따



1 2 3 4 5 6 7

Fig. 1. Changes of alcohol dehydrogenase activity by increasing concentrations of N-nitrosoethylurea (NEU). After electrophoretic separation of the enzyme on the polyacrylamide gel, activity staining was performed. Lane 1: control, lane 2: 0.2 mM NEU, lane 3: 0.39 mM NEU, lane 4: 0.78 mM NEU, lane 5: 1.56 mM NEU, lane 6: 3.13 mM NEU, lane 7: 6.25 mM NEU.



1 2 3 4 5 6 7

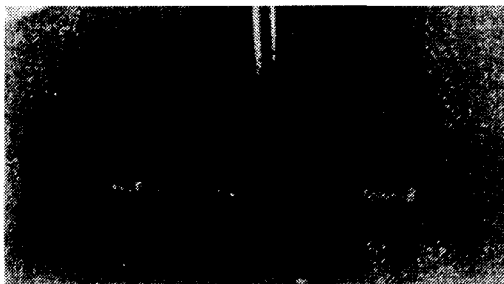
Fig. 2. Changes of aldehyde dehydrogenase activity by increasing concentrations of N-nitrosoethylurea (NEU). After electrophoretic separation of the enzyme on the polyacrylamide gel, activity staining was performed. Lane 1: control, lane 2: 0.2 mM NEU, lane 3: 0.39 mM NEU, lane 4: 0.78 mM NEU, lane 5: 1.56 mM NEU, lane 6: 3.13 mM NEU, lane 7: 6.25 mM NEU.

라서 N-nitrosoethylurea 처리로 인한 세포내 지질 과산화물의 함량을 측정하였다(Table 2). 그 결과 지질 과산화물의 함량은 NEU의 농도가 증가할수록 증가하여 6.25 mM의 NEU에 의하여 대조군에 비하여 약 2.5배의 증가를 보였다. N-nitrosodiethylamine의 경우 반복투여군에서 지질 과산화물의 함량이 최대 10배까지 증가하였다(Kim *et al.* 1999). 이러한 결과는 NEU에 의한 지

Table 3. Effects of N-nitrosoethylurea on the activities of antioxidant enzymes from rat liver cell

Carcinogen	Concentration (mM)	GST*	CAT*	SOD*	GR*
	0	100	100	100	100
N-nitrosoethylurea	0.39	107±1.4	95±3.1	112±1.4	125±3.5
	1.56	105±2.2	123±2.2	150±2.4	204±2.1
	6.25	110±2.9	120±1.8	151±1.5	298±2.2

GST*: glutathione transferase CAT*: catalase SOD*: superoxide dismutase GR*: glutathione reductase



1 2 3 4 5 6 7

Fig. 3. Changes of glutathione transferase activity by increasing concentrations of N-nitrosoethylurea (NEU). After electrophoretic separation of the enzyme on the polyacrylamide gel, activity staining was performed. Lane 1: control, lane 2: 0.2 mM NEU, lane 3: 0.39 mM NEU, lane 4: 0.78 mM NEU, lane 5: 1.56 mM NEU, lane 6: 3.13 mM NEU, lane 7: 6.25 mM NEU.

질 과산화물의 현격한 증가로 인하여 세포가 심각한 산화스트레스를 받고 있음을 의미한다. 산화스트레스를 받는 세포에는 활성산소종을 직접, 간접적으로 소거할 수 있는 항산화 방어기구가 활성화되어 있다. 세포내 항산화효소로는 glutathione transferase, superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase 등을 들 수 있다.

Table 3에서는 N-nitrosoethylurea 처리에 의한 clone9 세포주의 항산화효소의 활성변화를 측정하였다. 전암성 병변의 지표로 사용되는 glutathione transferase의 경우 NEU 전 농도구간에서 활성변화를 거의 볼 수 없었다. NEU처리에 의하여 지질 과산화물의 함량은 최대 2.5 배 증가하였으나 glutathione transferase의 활성증가는 약 5~7%에 불과하였다. 뿐만 아니라 전기영동상에서의 활성염색의 패턴 변화도 거의 관찰할 수 없었다(Fig. 3). Glutathione transferase는 쥐의 화학적 간암 유도과정에서 정상 간 조직에서는 발견되지 않고 간암의 전암성 병소에서 현저히 높게 발견되는 것이 밝혀져 전암성 병소의 지표인자로서 유용하게 쓰이고 있다(Canuto *et al.* 1993). 따라서 본 실험에서 glutathione transferase의

활성증가가 미미하지만 지질 과산화물의 함량이 현격하게 증가하는 것으로 보아, NEU로 처리된 간세포가 지질과산화물의 축적으로 인한 산화스트레스를 받고 있으며 발암화과정의 초기단계에 있는 것으로 생각된다. 활성산소종인 hydrogen peroxide의 소거반응에 직접 참여할 수 있는 catalase의 활성증가도 대조군에 비하여 최대 20% 증가에 불과하였다. 이에 비하여 glutathione reductase의 활성은 NEU 처리에 따라 현격하게 증가하였다. 6.25 mM NEU에 의하여 glutathione reductase의 활성이 약 3배 증가하였다. 뿐만 아니라 superoxide dismutase의 활성도 6.25 mM의 NEU에 의하여 약 1.5배 증가하였다. 이러한 결과를 통하여 N-nitrosoethylurea 처리로 인해 증가한 활성산소종과 과산화지질에 대한 항산화 방어기작에 특히 glutathione reductase와 superoxide dismutase의 활성증가가 중요한 역할을 할 것으로 추측할 수 있다.

적 요

N-nitrosoethylurea (NEU)에 의한 지질 과산화물의 함량 변화와 알데히드 대사효소 및 항산화효소의 활성변화를 쥐 간세포에서 측정하였다. 알데히드 대사효소는 alcohol dehydrogenase와 aldehyde dehydrogenase가 사용되었고 항산화효소로는 glutathione transferase, superoxide dismutase, glutathione reductase와 catalase가 사용되었다. 쥐 간세포에 다양한 농도의 NEU를 처리한 후 지질 과산화물의 함량변화를 측정하였다. 그 결과 6.25 mM NEU에 의하여 지질 과산화물의 함량이 최대 2.5배 증가하였다. Alcohol dehydrogenase의 활성은 NEU처리에 의하여 대조군보다 최대 2.3배 증가하였고 aldehyde dehydrogenase의 활성은 약 2배 증가하였다. 전암성 병변의 지표로 이용되는 glutathione transferase와 catalase의 경우 NEU 처리에 의한 활성증가가 미미하였다. 그러나 superoxide dismutase의 활성은 최대 1.5배 증가하였고, glutathione reductase의 활성은 약 3

배 증가하였다. 그러므로 superoxide dismutase와 glutathione reductase의 활성증가가 NEU의 독성에 대한 세포내 항산화 방어과정에서 중요한 역할을 할 것으로 추측된다.

사 사

본 연구는 김현배군의 도움으로 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Anderson LM, AB Jones and RM Kovatch. 1990. Effect of pretreatment with beta-naphthoflavone on tumorigenesis by N-nitrosoethylurea in five mouse strains. *Cancer Lett.* 52:91-94.
- Beniashvili DS, S Benjamin, DA Baturin and VN Anisimov. 2001. Effect of light/dark regimen on N-nitrosoethylurea-induced transplacental carcinogenesis in rats. *Cancer Lett.* 163:51-57.
- Brown-Peterson NJ, RM Krol, Y Zhu and WE Hawkins. 1999. N-nitrosodiethylamine initiation of carcinogenesis in japanese medaka (*Oryzias latipes*): hepatocellular proliferation, toxicity and neoplastic lesions resulting from short term, low level exposure. *Toxicol. Sci.* 50: 186-194.
- Buzard GS, T Enomoto, LM Anderson, AO Perantoni, DE Devor and JM Rice. 1999. Activation of neu by missense point mutation in the transmembrane domain in schwannomas induced in C3H/HeNcr mice by transplacental exposure to N-nitrosoethylurea. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 125:653-659.
- Canuto RA, M Ferro, RA Salvo, AM Bassi, A Trombetta, M Maggiora, G Martinasso, R Lindahl and G Muzio. 2001. Increase in class 2 aldehyde dehydrogenase expression by arachidonic acid in rat hepatoma cells. *Biochem. J.* 357:811-818.
- Canuto RA, G Muzio, M Maggiora, ME Biocca and MU Dianzani. 1993. Glutathione-S-transferase, alcohol dehydrogenase and aldehyde reductase activities during diethylnitrosamine-carcinogenesis in rat liver. *Cancer Letters* 68:177-183.
- Eckl P and H Esterbauer. 1989. Genotoxic effects of 4-hydroxynonenal. *Adv. Biosci.* 76:141-146.
- Farber E. 1984. The multistep nature of cancer development. *Cancer Res.* 44:4217-4223.
- Feinstein RN and EC Cameron. 1972. Aldehyde dehydrogenase activity in a rat hepatoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48:1140-1146.
- Hasegawa R, M Futakuchi, Y Mizoguchi, T Yamaguchi, T Shirai, N Ito and W Lijinsky. 1998. Studies of initiation and promotion of carcinogenesis by N-nitroso compounds. *Cancer Lett.* 123:185-191.
- Hempel J, I Kuo, J Perozich, BC Wang, R Lindahl and H Nicholas. 2001. Aldehyde dehydrogenase. Maintaining critical active site geometry at motif 8 in the class 3 enzyme. *Eur. J. Biochem.* 268:722-726.
- Kim HB, YN Yum and MY Lee. 1999. The changes of enzymes activities during diethylnitrosamine-induced carcinogenesis of cultured rat liver cell. *J. Toxicol. Pub. Health* 15:183-190.
- Lindahl R. 1977. Aldehyde dehydrogenase in 2-acetaminofluorene-induced rat hepatomas. *Biochem. J.* 164:119-123.
- Lindahl R. 1992. Aldehyde dehydrogenase and their role in carcinogenesis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 27:283-290.
- Malashenko AM and SV Vasileva. 1985. Modification of the genetic effect of N-nitrosoethylurea in inbred mice by para-aminobenzoic acid. *Genetika* 21:582-585.
- Marselos M and G Michalopoulos. 1987. Changes in the pattern of aldehyde dehydrogenase activity in primary and metastatic adenocarcinomas of the human colon. *Cancer Letters.* 34:27-37.
- Mitchell DY and DR Petersen. 1987. The oxidation of α, β unsaturated aldehydic products of lipid peroxidation by rat liver aldehyde dehydrogenase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 87:403-410.
- Muzio G, RA Canuto, T Arombetta and M Maggiora. 2001. Inhibition of cytosolic class 3 aldehyde dehydrogenase by antisense oligonucleotides in rat hepatoma cells. *Chem. Biol. Interact.* 130-132: 219-225.
- Nebert DW, AK Jaiswal, UA Meyer and FJ Gonzalez. 1987. Human P-450 genes : evolution, regulation and possible role in carcinogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* 15: 586-589.
- Nebert DW, DD Petersen and AJ Fornace. 1990. Cellular response to oxidative stress: the Ah gene battery as a paradigm. *Environ. Health Perspect* 88:13
- Ohgaki H, P Kleihues and GC Hard. 1991. Ki-ras mutations in spontaneous and chemically induced renal tumors of the rat. *Mol. Carcinog.* 4:455-459.
- Richmond RE, JH Carter, HW Carter, FB Daniel and AB Deangelo. 1996. Hepatocyte expression of tumor associated aldehyde dehydrogenase (ALDH-3) and p21 Ras following diethylnitrosamine initiation and chronic exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate. *Carcinogenesis*

17:1647-1655.

Rushmore TH and E Faber. 1987. Identification of a characteristic cytosolic polypeptide of rat preneoplastic hepatocyte nodules as placenta glutathione-S-transferase. *Biochim. Biophysic. Res. Com.* 143:98-103.

Seyama T, T Kajitani, A Inoh, K Yanagihara, K Kamiya and K Yokoro. 1985. Synergistic effect of radiation and N-nitrosoethylurea in the induction of lymphoma in mice: cellular kinetics and carcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.* 76:20-27.

Sophos NA, A Pappa, TL Ziegler and V Vasiliou. 2001. Aldehyde dehydrogenase gene superfamily : the 2000 upd-

ate. *Chem. Biol. Interact.* 130:323-337.

Tsao MS, JW Grisham, KG Nelson and JD Smith. 1985. Phenotypic and karyotypic changes induced in cultured rat hepatic epithelial cells that express the "oval" cell phenotype by expose to N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Am. J. Pathol.* 118:306-315.

Wymore T, HB Nicholas and J Hempel. 2001. Molecular dynamics simulation of class 3 aldehyde dehydrogenase. *Chem. Biol. Interact.* 30:201-207.

(Received 26 April 2002, accepted 15 May 2002)