

Heme oxygenase-1 유도를 통한 화학 암예방 및 세포보호와 그 분자생물학적 기전

김은희 · 김성환 · 나혜경 · 서영준*

서울대학교 약학대학 발암기전 및 분자암예방 국가지정 연구실

Chemoprevention and Chemoprotection Through Heme Oxygenase-1 Induction and Underlying Molecular Mechanisms

Eun-Hee Kim, Sung-Hwan Kim, Hye-Kyung Na, and Young-Joon Surh*

National Research Laboratory of Molecular Carcinogenesis and Chemoprevention,
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, South Korea

(Received November 15, 2006 / Accepted December 15, 2006)

ABSTRACT : Heme oxygenase (HO)-1 is an important antioxidant enzyme that plays a pivotal role in cellular adaptation and protection in response to a wide array of noxious stimuli. Thus, HO-1 induction has been associated with prevention or mitigation of pathogenesis of various diseases, including acute inflammation, atherosclerosis, degenerative diseases, and carcinogenesis. Recent progress in our understanding of the function of molecules in the cellular signaling network as key modulators of gene transcription sheds light on the molecular mechanisms underlying HO-1 gene expression. A panel of redox-sensitive transcription factors such as activator protein-1, nuclear factor-kB, and nuclear factor E2-related factor-2, and some of the upstream kinases have been identified as prime regulators of HO-1 gene induction. This review summarizes molecular mechanisms underlying HO-1 expression and the significance of targeted induction of HO-1 as a potential chemopreventive or chemoprotective strategy.

Key words : Heme oxygenase-1, Nrf2, Chemoprevention, Chemoprotection

서 론

역사적으로 세포 내에서 분해과정을 촉진하는 효소들은 동화/생합성 반응 (anabolic) 촉매들에 비해 그리 많은 관심을 끌지 못하였다. Heme (Fe-protoporphyrin)을 일산화 탄소 (carbon monoxide; CO), biliverdin과 free heme iron으로 산화적으로 분해시키는 microsomal 효소인 heme oxygenase (HO)는 최초 발견시 cytochrome P450 family의 한가지 새로운 구성원으로 알려졌기 때문에 한동안 흥미를 끌지 못했다 (Tenhunen *et al.*, 1968). 따라서 HO 발견 후 한동안은 이 효소의 heme 분해 작용을 유도하는 자극의 수와 종류에 대한 연구는 cytochrome P450 turnover 그리고 약물대사와의 관련성 측면에서 주로 수행되었다.

이 효소의 두 번째 형태인 HO-2가 뇌에 두드러지게 많이 존재함이 밝혀지고, 이로써 HO가 뇌에서 heme 분해 말고도 다른 기능을 할 것이라는 추측을 불러일으키면서 이

효소의 기능이 재조명되기 시작하였다. 이후 그 효소작용의 생성물들 (즉, CO, biliverdin, free iron)이 갖는 항산화, 항염증, 그리고 세포사멸 억제 (anti-apoptosis) 효과 등이 HO의 생리적 기능에 기여한다는 여러 가지 증거들이 밝혀졌다. 현재까지, 다양한 포유류에서 조직 특이적인 유전자 발현 패턴을 갖는 3가지 HO의 동종효소들 (isozymes), 즉 HO-1, HO-2 그리고 HO-3가 발견되었다 (Tenhunen *et al.*, 1968; Maines *et al.*, 1986; Maines, 1988; McCoubrey *et al.*, 1997). 32-kDa heat shock protein과 일치하는 유도성 효소 (inducible isoform)인 HO-1은 진화적으로 보존되어 있고 조직에 편재적으로 분포되어 있다 (Maines, 1988). HO-2는 36-kDa 크기의 본태성 (constitutive) 동종효소로서, 주로 뇌와 고환에서 발현된다 (Maines *et al.*, 1986). 최근에 발견된 HO-3는 HO-2와 매우 비슷한 33-kDa isoform이다. 이것의 mRNA가 많은 장기에서 발견되긴 하지만 다른 두 isoform들과 달리 효소 활성이 매우 낮기 때문에 HO-3의 생리적 기능은 아직 제대로 밝혀지지 않았다 (McCoubrey *et al.*, 1997).

*To whom correspondence should be addressed

HO-1의 발현은 이것의 기질인 heme과 그 밖에 자외선, 저산소증, 염증, 중금속, 과산화수소와 산화질소를 포함하는 다양한 자극들에 의해 유도된다. 따라서 HO-1의 유도는 산화적(pro-oxidative) 그리고 염증적(pro-inflammatory) 자극에 대한 생체 방어 반응에 있어서 중요하다. Activator protein (AP)-1, nuclear factor- κ B (NF- κ B), nuclear factor E2-related factor-2 (Nrf2) 그리고 biliverdin reductase (BVR)들은 외부 자극에 대한 반응에서 HO-1 유도를 조절하는 주요 전사인자(transcription factor)들로 제시되었다 (Alam *et al.*, 1994; Lavrovsky *et al.*, 1994; Takeda *et al.*, 1994; Morse and Choi, 2002; Otterbein *et al.*, 2003). HO-1를 유도할 수 있는 자극에 세포가 노출되면 the mitogen-activated protein kinases (MAPKs) (Elbirt and Bonkovsky, 1999), protein kinase A (PKA) (Immenschuh *et al.*, 1998; Rensing *et al.*, 2004), protein kinase C (PKC) (Terry *et al.*, 1999; Numazawa *et al.*, 2003), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (Salinas *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004)들과 같은 몇 가지 상위 인산화 효소들이 활성화되고 결과적으로 전술한 전사인자들의 DNA-binding 활성이 증가된다.

세포들은 산화적 혹은 친전자적 스트레스에 대한 반응으로, 일련의 방어 유전자를 활성화함으로써 세포적응(adaptive) 반응을 개시할 준비를 한다 (Dhakshinamoorthy *et al.*, 2000; Jaiswal, 2000). 활성 산소종과 친전자체의 과도한 세포 내 축적을 초래하는 심한 산화적 스트레스는 세포막과 중요한 세포 내 거대분자들에 손상을 일으킴으로써, 조직이 퇴행성 질환이나 돌연변이 유발, 그리고 암을 포함하는 다양한 질병 상황에 쉽게 처하게 한다 (Breen and Murphy, 1995; Jaiswal, 2004). HO-1의 유도는 세포 내 지질, 단백질 그리고 핵신들을 산화적 손상으로부터 보호하는 방어 메커니즘의 하나로 볼 수 있다 (Takahashi *et al.*, 2004). HO-1의 유도가 다양한 세포 및 조직 손상에 대해 강력한 보호 효과를 제공한다는 견해를 뒷받침하는 증거들이 축적되고 있다 (Choi *et al.*, 2002; Attuwaybi *et al.*, 2004; Srisook *et al.*, 2005; Uehara *et al.*, 2005). 한편 HO-1이 혈관생성과 세포 성장을 도와 암세포의 증식에 중요한 역할을 한다는 보고도 있다 (Dulak *et al.*, 2004). 즉 암세포에서는 HO-1의 능력을 제한함으로써 암세포의 성장을 억제할 수 있다는 것이다. 이 논문에서는 잠재적인 항암 및 암예방 전략으로서 HO-1 유도의 중요성을 주로 분자생물학적인 관점에서 논의하고자 한다.

HO-1 유도의 분자적 기전 (Molecular Basis Of HO-1 Induction)

다양한 스트레스에 반응하는 여러 다른 유전자들과 마찬가

지로 HO-1 유전자의 발현은 세포의 종류나 세포 내 미세환경 (cellular microenvironment), 자극의 강도와 지속 시간 등에 의존적이다. 일반적으로 HO-1의 유도는 상위 인산화 효소와 전사인자들로 이루어진 세포 내 신호전달 증폭회로 (intracellular signaling cascades) 활성화를 통해 진행된다. HO-1의 유도에 있어서 주요 인산화 효소들 및 전사인자들의 역할에 대해서는 다음 섹션에서 논의하기로 한다.

HO-1 유도를 매개하는 상위 신호전달 물질들의 역할 (Roles of upstream signaling molecules in mediating HO-1 induction)

다양한 세포 내 인산화 효소들 (대부분 serine/threonine kinases)은 외부자극에 반응하여 유전자 발현을 조절하는 주요 전사인자들을 타깃으로 하는 세포 내 신호 네트워크의 주요 구성원이다. HO-1 유전자 전사는 그 어떤 유전자보다도 많은 자극들에 의해 활성화된다. 이처럼 다양한 자극들이 있음은 HO-1 유전자의 promoter에 활성화된 factor들과 결합하는 multiple response elements들이 존재함을 시사한다.

MAPKs 회로는 외부 자극들과 HO-1 유도를 연결해주는 신호전달 회로 중 가장 먼저 밝혀진 signaling pathway이다. 이 MAPKs 회로와 연결된 많은 단백질들 중 상당수는 basic leucin zipper (bZip) family에 속한다. 초창기부터 알려진 구성원들에는 AP-1, activating transcription factor (ATF)/cyclic AMP response element binding protein (CREB), CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) 그리고 Maf protein 등이 있다. 좀 더 최근에 밝혀진 bZip 계열의 전사인자들에는 Bach-1과 Bach-2, Nrf2 그리고 biliverdin reductase (BVR) 등이 있다. bZip 계열 전사인자들은 다른 bZip factor들과 homodimeric 형태나 heterodimeric 형태로 DNA에 결합하기 때문에 그들의 효과는 dimeric partner에 따라 달라진다.

대표적 MAPKs에는 extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)와 c-Jun N-terminal kinases (JNK) 그리고 p38 MAPK 등이 있다. 외부 자극에 의해 특정 MAPK가 활성화되면 HO-1 유전자 발현을 유도한다. ERK, JNK 그리고 p38 MAPK는 쥐 폐에서 ischemia-reperfusion (I/R) 손상에 대한 반응으로 인한 HO-1 유전자의 전사 조절과정에 관련된 것으로 나타났다 (Zhang *et al.*, 2002). 간 종양과 내피세포에서 ERK1/2와 p38 MAPK는 sodium arsenite, oxidized phospholipids, nitric oxide (NO) 그리고 저산소증에 의한 HO-1 유전자 전사의 유도에 관련되어 있다 (Elbirt *et al.*, 1998; Chen and Maines, 2000; Ryter *et al.*, 2002; Kronke *et al.*, 2003). 그러나 MAPK 신호전달 회로를 통한 HO-1의 유도는 세포 종류와 종에 특

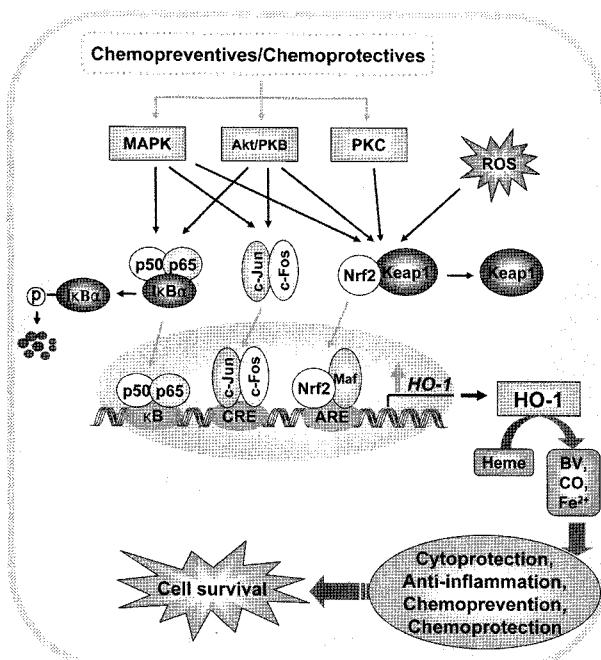


Fig. 1. Regulation of HO-1 expression is regulated by a panel of redox-sensitive transcription factors such as AP-1, NF-κB, and Nrf2 and their upstream kinases. Under basal conditions, these signaling molecules are normally located in the cytoplasm, but, upon challenge with inducing stimuli, the active form of each transcription factor translocates to the nucleus and subsequently binds to the specific DNA sequence, thereby upregulating HO-1 gene expression. Abbreviations: BV, biliverdin; CO, carbon monoxide; CRE, cAMP-response element; IκB α , inhibitor of NF-κB; PKB, protein kinase B.

화된 패턴을 가진다.

HO-1 유도에 관여할 것이라 생각되는 또 다른 signaling cascades는 PKC, PKA 그리고 PI3K이다. 최근의 몇몇 연구들은 HO-1 유전자 발현의 조절에서 PKC의 역할에 대해 언급하였다 (Numazawa *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004). Numazawa 등이 한 연구에 따르면 (Numazawa *et al.*, 2003), PKC 선택적 저해제인 Ro-31를 인체 섬유화 세포 (human fibroblast)인 WI-38 cell에 처리했을 때 phorone-이나 4-hydroxy-2,3-nonenal이 유도하는 HO-1 유전자 발현이 억제되는 것으로 나타났으며, 이를 통해 PKC가 HO-1 유도를 조절한다는 것을 추측할 수 있다. 이 연구는 또한 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA)에 세포를 장시간 노출 시켜도 HO-1 발현에 영향을 미치지 않는다는 것을 밝혀내어, TPA에 반응하지 않는 변칙적인 PKC 이성체가 HO-1 유도에 관여할 것이라고 제안하였다. 덧붙여, PKC의 활성화가 인간 내피세포에서 tumor necrosis factor-α, interleukin (IL)-1β 그리고 oxidized phospholipid에 의한 HO-1 유도과정에 연관되었음을 보였다 (Terry *et al.*, 1999; Kronke *et al.*, 2003).

반면에 심근 섬유화 세포(cardiac fibroblast)의 일시적인 glucose 상실은 PKC의 세포막으로의 이동을 통해서가 아니라 활성 산소종의 생성과 p38 MAPK의 활성화를 통해 HO-1을 유도하였다 (Takeda *et al.*, 2004).

cAMP나 3',5'-cyclic guanosine monophosphate (cGMP)의 세포 내 농도 증가 또한 HO-1 발현을 유도할 수 있다. 여러가지 호르몬들과 세포 외부의 자극에 의해 세포 내 cAMP의 level이 증가되면 PKA의 활성화를 일으킨다. PKA의 약물학적인 저해제인 KT5720을 전처리시 dibutyryl-cAMP (Bt₂cAMP)에 의한 HO-1 mRNA의 발현이 억제되었다 (Immenschuh *et al.*, 1998). Immenschuh 등 (Immenschuh *et al.*, 1998)은 Bt₂cAMP나 glucagon 같은 PKA 활성유도 물질을 랙드 간 1차배양 세포 (primary rat hepatocytes)에 처리하면 HO-1이 용량 의존적으로 유도됨을 보고하였다. cAMP와 마찬가지로, 일산화질소 방출 화합물 (NO-releasing agents)이나 유도성 일산화질소 합성효소 (inducible NO synthase)에 의한 가용성 guanylate의 활성화를 통한 cGMP의 증가도 HO-1 유전자 발현을 유도했다 (Motterlini *et al.*, 1996; Polte *et al.*, 1997; Polte and Schroder, 1998; Polte *et al.*, 2000).

PI3K/Akt 신호전달 경로는 pro-apoptotic 단백질의 비활성화나 스트레스로 인한 일반적인 활성 산소종 증가를 억제함으로써 세포 생존 신호 (survival signal)를 작동시킨다. PI3K/Akt pathway는 항산화 효소인 HO-1의 발현을 조절함으로써 세포 내 활성 산소종의 양을 조절한다. Salinas 등 (2003)은 HO-1이 PI3K/Akt에 의존적으로 유도됨으로써 신경 성장인자 (nerve growth factor)가 6-hydroxydopamine에 의한 PC12 cell의 apoptosis를 막는다는 것을 밝혀내었다. 이 연구는 또한 Akt1을 항상 활성화시켰을 때 HO-1의 발현이 증가되고, apoptosis와 활성 산소종이 억제되는 것을 보여주었다. 덧붙여 human vascular smooth muscle cell을 simvastatin으로 처리하면 HO-1을 유도할 수 있었는데, 이 과정은 PI3K의 특이적인 저해제에 의해 억제되었다 (Lee, *et al.*, 2004). 이는 HO-1 유도가 PI3K/Akt pathway를 통해 매개됨을 나타낸다. 최근 김 등의 연구 또한 인간 유방암 (MCF-7) 세포에서 15-deoxy-Δ^{12,14}-prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂)에 의한 HO-1의 유도과정에 PI3K/Akt signaling pathway가 연관됨을 시사하였다 (Kim *et al.*, 2004). 다른 연구들도 15d-PGJ₂가 유도한 HO-1 발현에 있어 PI3K/Akt signaling pathway의 역할을 언급하였다 (Alvarez-Maqueda *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004). Human neuroblastoma SH-SY5Y cells에서 PI3K가 중개하는 Nrf2의 활성화는 hemin에 의한 HO-1 유도과정의 주요 pathway로 제안되었다 (Nakaso *et al.*, 2003). Akt/protein kinase B는 전사

단계에서 HO-1 발현을 통제하는 역할 외에도 HO-1의 serine-188 residue를 인산화시킴으로써 HO-1의 post-translation modification을 유도하는 것으로 나타났다 (Salinas *et al.*, 2004).

HO-1 유도에 있어서 전사인자들의 역할 (Roles of transcription factors in HO-1 induction)

인간을 포함한 포유류의 HO-1 유전자의 배열과 구성에 대한 분석으로 그 전사 조절이 HO-1 유전자 promoter의 5'-flanking region에 위치한 inducible regulatory element들에 의해 수행된다는 것이 밝혀졌다 (Shibahara *et al.*, 1989; Lavrovsky *et al.*, 1993; Alam *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 2000). 이러한 regulatory element들은 NF-κB, AP-1/2 (Lavrovsky *et al.*, 1994), C/EBP (Rushworth and O'Connell, 2004), hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) (Lee *et al.*, 1997; Jozkowicz *et al.*, 2002), CREB (Kronke *et al.*, 2003), Nrf2 (Alam *et al.*, 1999; Alam *et al.*, 2000)와 같은 몇 가지 산화환경에 민감한 전사인자들의 결합부위 (binding site)이다. 특히, 인간의 HO-1 유전자는 cadmium-responsive element (TGCTAGATTT) 바로 downstream에 putative Maf recognition element (MARE)를 포함한다 (Takeda *et al.*, 1994). 비록 인간의 유전자에서도 heat shock element에 대한 putative silencer sequence가 발견되긴 했지만, 이 element는 기능을 할 수가 없고 HO-1 mRNA 발현의 heat inducibility를 제공할 수 없다 (Shibahara *et al.*, 1989). 즉, 여러 종들에 걸쳐 functional promoter의 차이가 관찰되어 왔고, 이것으로 HO-1 유도를 일으키는 자극에 대한 반응에 있어서의 종 차이를 설명할 수 있을 것이다.

AP-1 and NF-κB AP-1과 NF-κB는 유전자의 promoter 부분에 결합해서 HO-1을 활성화시킬 수 있는 주요 전사인자이다. 전사인자인 AP-1은 Jun과 Fos family, Jun dimerization partners 그리고 밀접하게 관련된 activating transcription factor subfamily들로 이루어진 basic leucine zipper protein들의 dimeric 조합이다 (Karin *et al.*, 1997). Alam과 Den의 연구에 따르면 (Alam and Den, 1992), 종양촉진제인 TPA에 의한 마우스 HO-1 유도에는 타깃 유전자의 5'-flanking 영역에 AP-1이 결합하는 것이 필수적이다. Heme (Shan *et al.*, 2004), sodium arsenite, cobalt chloride (Lu *et al.*, 2000), bacterial lipopolysaccharide (Camhi *et al.*, 1998), 화석연료의 불완전 연소 시에 발생하는 respirable particulate matters (Chin *et al.*, 2003) 그리고 cobalt protoporphyrin (Shan *et al.*, 2004)과 같은 다른 산화적인 자극에 의한 HO-1의 유도 또한 AP-1의 활성화를 통해 이루어진다는 것이 후속 연구에서 확인되었다. AP-1을 통한

HO-1의 유도는 항산화제인 *N*-acetyl-L-cysteine에 의해 억제될 수 있으므로 (Camhi *et al.*, 1998), 활성 산소종은 AP-1에 의존적인 HO-1 유전자 전사에 이르는 신호 전달을 시작함에 있어 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

AP-1과 더불어, AP-2와 NF-κB 같은 다른 전사인자들도 human erythroleukemic cell line K562에서 HO-1 기질인 heme에 대한 반응으로서 HO-1의 활성화 및 발현의 유도에 중요한 역할을 한다 (Lavrovsky *et al.*, 1994). NF-κB를 억제했을 때 hemin이나 cadmium (Chen *et al.*, 2004), lipopolysaccharide (Wijayanti *et al.*, 2004) 같은 외부 자극들에 의한 HO-1의 유도가 억제되는 것으로 보아 이러한 물질들이 NF-κB signaling pathway를 통해 HO-1의 전사를 활성화시킬 수 있음을 알 수 있다. 덧붙여, Lavrovsky 등 (Lavrovsky *et al.*, 2000)은 인간 간암 세포주인 HepG2 cell에서 NF-κB의 과발현은 HO-1 mRNA 발현 증가를 유도함을 밝혀내었다. 인간 renal proximal tubule cells에서 curcumin이 매개한 HO-1의 활성화 또한 NF-κB의 활성화를 통해 매개됨이 보고되었다 (Hill-Kapturczak *et al.*, 2001).

Nrf2 처음에는 HO-1 gene promotor에 위치한 antioxidant response element (ARE) sequence가 AP-1 전사인자와의 상호작용으로 스트레스에 대한 반응성을 조절하는 것으로 생각되었지만, 최근에는 바로 그 sequence가 다른 전사인자인 Nrf2와 상호작용하는 것으로 나타났다 (Alam *et al.*, 1999; Alam *et al.*, 2000). 66-kDa protein인 Nrf2는 basic leucine zipper transcription factors의 Cap'n'Collar family의 구성원이고 해독화, 항산화 및 HO-1을 포함하는 stress inducible gene들의 발현에 필수적인 역할을 담당한다 (Itoh *et al.*, 1997). 전체적으로, Nrf2에 의해 조절되는 특징적인 단백질들은 외인성 물질 (xenobiotics)들을 해독화하고 단백질 산화를 줄이며 세포 내 환원력 (reducing equivalents)을 유지하고 산화환경 반응을 중단시키며 활성 산소종의 해로운 효과들을 억제하는 기능을 한다 (Owuor and Kong, 2002; Jaiswal, 2004).

Nrf2가 결핍된 마우스는 독성 화학물질에 의해 더 쉽게 조직 손상을 입는 것으로 나타나 산화적/질화적 스트레스에 대한 adaptive response에서 Nrf2가 중요한 기능을 담당함을 알 수 있었다 (Chan and Kan, 1999; Chan *et al.*, 2001; Enomoto *et al.*, 2001). Nrf2 결핍 쥐는 또한 benzo [α]pyrene으로 유도된 위종양에 훨씬 더 높은 위험성을 보였고, 한편 화학암예방제 (chemopreventive agent)인 oltipraz [4-methyl-5-(2-pyrazinyl)-1,2-dithiol-3-thione]에 대한 반응성은 감소하는 것으로 나타났다 (Ramos-Gomez *et al.*, 2001). Ishii 등 (Ishii *et al.*, 2000)에 따르면, Nrf2 결핍된 쥐의 복막 macrophages는 유독한 친전자체에 더 민

감한 것으로 밝혀졌다.

Nrf2는 세포질에서 저해단백질인 kelch-like ECH-associated protein-1 (Keap1)과 비활성 복합체를 이루어 핵으로부터 격리되어 있다. 억제 단백질인 Keap1으로부터 Nrf2가 분리되어 나오는 것이 Nrf2의 핵 안으로의 이동에 필수적이다. small Maf protein과 heterodimer를 형성해서 활성화된 Nrf2는 common core sequence를 가지고 있는 *cis*-elements (다른 말로 MARE, ARE 혹은 electrophile/stress response elements 라 알려져 있는)에 결합한다 (Lee and Surh, 2005). 그렇게 함으로써 HO-1을 포함하는 타깃 유전자를 유도하게 된다.

Nrf2/ARE가 중개하는 유전자 발현을 조절하는데 있어서 Keap1과 Bach1 단백질은 둘 다 중요하다. Keap1은 Nrf2의 repressor로서 작용한다. Keap1 결합 줄은 높은 Nrf2 활성을 보이고 출생 후 살아남지 못하는데 이는 아마도 식도와 전위부의 과자화 현상으로 인한 영양결핍 때문으로 생각된다 (Wakabayashi *et al.*, 2003). 포유류의 heme-responsive transcriptional repressor인 Bach1은 small Maf proteins와 heterodimer를 형성함으로써 Nrf2가 활성화되어 DNA에 결합하는 것을 막는다 (Ogawa *et al.*, 2001). 이 때문에 HO-1과 Bach1의 발현은 서로 반대로 조절된다 (Kitamuro *et al.*, 2003). 비록 HO-1이 Bach1/small Maf heterodimer에 의해 억제되기는 하지만, Nrf2/small Maf heterodimer에 의해 활성화된다 (Suzuki *et al.*, 2003). 최근에, Dhakshinamoorthy 등 (2005)은 Bach1과 Nrf2가 HepG2 cell에서 ARE를 통한 유전자 발현을 조절하는데 있어서 서로 경쟁적으로 작용한다는 것을 밝혀내었다. 따라서 ARE에 의해 매개되는 유전자 발현의 조절은 핵 안의 Bach1과 Nrf2의 독특한 균형에 의해 결정된다고 볼 수 있다.

BVR & Other Transcription factors Biliverdin reductase (BVR)은 가장 최근에 발견된 bZip transcription factor family 중의 하나이고 (Ahmad *et al.*, 2002) insulin/IGF-1 signaling (MAPK와 PI3-K)의 주요 경로에서 signaling pathway의 구성원이다 (Ahmad *et al.*, 2002; Lerner-Marmarosh *et al.*, 2005; Miralem *et al.*, 2005). BVR이 HO-1 조절을 위해 insulin/IGF-1 signaling pathway의 양 줄기를 통합하는 메커니즘이나 작용한다는 것이 점차 명확해지고 있다. HO-1 유전자 발현 조절에 관련된 많은 수의 유전자들이 BVR에 의해 통제되는 것으로 나타나고 있다 (Kravets *et al.*, 2004). 이런 타깃 유전자들은 인간 신장 세포 (h293A cell)에서 사람 BVR을 adenovirus construct를 이용해 과발현시키고 cell signaling gene의 expression profile을 microarray로 분석함으로써 확인되었다 (Kravets *et al.*, 2004). 이를 타깃 유전자에는

ATF-2/CREB-2, c-Jun, HSF-1 (heat shock transcription factor-1), Bcl2, COX-2, PKC α , heat shock protein 90과 27 그리고 WISP3 (inducible signaling pathway protein 3) 등이 있다.

ATF-2는 constitutive transfactor로 c-Jun (발현이 유도 가능한 형태로 이뤄지는)과 달리 유전자 발현이 세포 외부의 신호들에 독립적으로 이뤄진다 (Angel and Karin, 1991; Herdegen and Leah, 1998). ATF-2는 BVR과 c-Fos (Fos-like), c-Jun, c-Myc, Bach-1, Maf, NF-E2 들과 마찬가지로 bZip 단백질이고 DNA에 homo나 heterodimeric 형태로 결합한다. BVR은 전사, 단백질의 발현 및 인산화를 높임으로써 ATF-2의 활성을 조절한다. BVR과 ATF-2 promoter 영역인 cAMP response element (CRE) site (Alcaraz *et al.*, 2003)와의 직접적인 상호작용이 ATF-2 전사와 활성화 메커니즘의 기초가 된다 (Miralem *et al.*, 2005). CRE-binding site는 7염기쌍인 AP-1 site (TGACTCA)에 염기 하나가 첨가되어 차이가 난다 (homodimeric 형태의 BVR과 AP-1 site에 결합한다) (Ahmad *et al.*, 2002). c-Jun이 AP-1 site에 붙으면 산화적 스트레스에 반응하는 유전자 발현을 활성화시킨다 (c-Jun은 전사 활성화가 BVR에 의해 조절되는 것이 확인된 유전자들 중 하나이다) (Miralem *et al.*, 2005). 이것은 알려진 c-Jun homodimer에 의한 autoregulatory transactivation에 영향을 끼침으로써 c-Jun 유전자 발현을 조절하는데 있어 중요한 역할을 수행할 것이다. ATF/CREB family의 구성원들은 원래 특별히 palindromic sequence (TGACNTCA)에 결합한다고 알려져 왔다.

MAPKs signaling pathway의 활성화와 c-Jun/c-Fos-AP-1 결합이 HO-1 유도의 중요한 메커니즘이기는 하지만, 후자는 cAMP에도 반응한다 (Durante *et al.*, 1997). 따라서, ATF-2 활성의 증가는 CRE와 혹은 AP-1 site의 활성화를 통해 직접적으로 HO-1 발현에 영향을 끼친다. BVR의 기질인 biliverdin은 *in vitro*에서 AP-1-BVR 복합체 형성을 막고 *in vivo*에서 HO 효소 활성을 억제한다. Biliverdin은 *in vivo* (Kutty and Maines, 1984)와 *in vitro* (Miralem *et al.*, 2005)에서 모두 HO 활성을 억제시키는 것으로 확인된 유일한 정상 세포 구성요소이다.

ATF-2 level이 증가하면 이는 평상시 c-Jun의 dimer partner인 c-Fos와 경쟁하게 된다. ATF-2/c-Jun heterodimer는 우선적으로 ATF-2의 통상적인 결합위치가 아닌 7염기 AP-1 site에 결합한다 (Herdegen and Leah, 1998). 더군다나 ATF-2/c-Jun dimer-DNA 복합체는 c-Fos/c-Jun dimer-DNA 복합체보다 더 안정적이다 (Benbrook and Jones, 1990; Haghmeyer *et al.*, 1993).

Heterodimerization은 ATF-2의 DNA 결합위치와 결합 친

화도뿐만 아니라 (Hagmeyer *et al.*, 1993) dimeric partner의 유전자 조절 활성에도 영향을 미친다. 따라서 BVR의 ATF-2 유전자 발현을 유도하는 능력은 세포의 유전자 발현 profile을 바꿀 수 있다. 예를 들어, c-Jun과의 heterodimerization은 HO-1 발현의 유도물질인 growth factor, chemo-kines나 cytokines를 통제하는 유전자 발현 패턴에 지속된 변화를 일으킨다 (Angel and Karin, 1991). 더 나아가서, 전사인자인 ATF/CREB family의 구성원은 HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1)의 DNA 인지 부위(recognition site)에도 결합할 수 있다 (Kvietikova *et al.*, 1995). 그 연장으로서, 저산소증에 의해 유도되는 HO-1 발현을 조절하는 BVR의 기능을 예측해 볼 수 있다. iNOS 발현을 조절하며 혈관 염증반응과 동맥경화와 같은 상태로 이르는 signaling pathway의 구성원인 NF-κB의 활성도 ATF-2에 의해 영향 받는다 (Peng *et al.*, 1995; Motterlini *et al.*, 2000). NO radical은 HO-1의 알려진 유도물질 중 하나이다.

HO-1 발현을 유도하는 물질들은 공통적으로 세포 내 thiol/disulfide (SH/S-S) 비율을 낮춘다는 것이 관찰되었다 (Maines, 1984; Raju and Maines, 1996). Bach-1은 저산소증에 의해 유도되는 유전자이다. 세포에서 GSH/GSSG의 비율은 Nrf2의 ARE나 StRE로의 결합과 HO-1의 활성화에 영향을 끼친다. Nrf2는 세포질에서 Keap1에 결합해서 보존되어 있는데, 세포가 산화적 스트레스에 노출되면 Keap1 cysteine residues의 계속되는 산화로 Keap1으로부터 떨어져 나와 핵으로 들어가게 된다 (Itoh *et al.*, 2004; Srivastava *et al.*, 2005).

BVR은 아마도 Bach-1의 유전자 억제 능력을 조절함으로써도 HO-1 발현에 영향을 끼칠 것이다. Bach-1은 small Maf 단백질 (AP-1/CRE recognition site의 유전자 발현을 활성화시키는)과 heterodimer를 형성하는 heme-regulated 전사 억제자이다 (Blank and Andrews, 1997). 이 heterodimer는 Maf가 DNA의 MARE sequence motif를 인식하는 것을 막는다 (Ogawa *et al.*, 2001). BVR 또한 AP-1/CRE elements에 결합하기 때문에 (Ahmad *et al.*, 2002; Miralem *et al.*, 2005), 그리고 Maf 단백질이 AP-1 전사인자 family와 heterodimer를 형성하기에 (Blank and Andrews, 1997) 만약 BVR-Maf 복합체가 형성된다면 Bach-1의 억제 능력을 막을 것이고 HO-1의 유도가 일어나도록 할 것이다 (Mayer *et al.*, 2003). 저산소증에 따른 HIF-1 DNA-binding 활성 증가는 rat 동맥혈관 smooth muscle에서 HO-1 유전자 발현을 유도했다 (Lee *et al.*, 1997). 덧붙여, HIF-1α small interfering RNA (siRNA)를 human lung cancer A549 cell에 주입한 결과 저산소증에 의한 HO-1 유전자 발현을 현저하게 억제시켰다 (Hanze *et al.*, 2003). 하지만

HIF-1 의존적인 HO-1 유전자 활성화 메커니즘과 비의존적인 메커니즘 들 다 보고되었다 (Gong *et al.*, 2001). 최근에는 CREB도 인간 텃줄 혈관 내포피 세포 (HUVEC)에서 산화된 phospholipids에 의해 유도된 HO-1 발현에 관여하고 있음이 밝혀졌다 (Kronke *et al.*, 2003).

치료 타깃으로서의 HO-1 (HO-1 as Therapeutic Target)

HO-1은 지질의 과산화, 단백질 산화, RNA/DNA 손상 등에 대한 방어 작용을 한다. HO-1이 매개하는 세포 보호 작용은 산화적인 스트레스에 민감한 조직에서 결정적인 역할을 한다 (Schipper, 2000; Perrella and Yet, 2003). 세포와 조직의 보호 작용에 대한 HO-1의 역할은 몇 가지 산화적 손상 (예를 들어 endotoxic shock (Rensing *et al.*, 2001), 빈혈 (Wang *et al.*, 2005), 출혈성 쇼크 (Tamion *et al.*, 2001), 과산소증 (Cho *et al.*, 2002; Pomeranec *et al.*, 2004) 그리고 급성 염증 (Willis, 1995) 등)을 유도하는 동물 모델을 이용한 실험을 통해 뒷받침되고 있다. 다양한 실험적 증거들로부터 HO-1의 증가가 스트레스에 의한 세포 손상에 대한 저항성을 제공해 주며 그에 반해 HO 활성을 막으면 세포 보호 작용을 저해하여 조직에 심각한 손상을 일으킨다는 것이 확인되고 있다 (Morimoto *et al.*, 2001; Ryter and Choi, 2005).

HO-1 유도는 산화적 스트레스에 대한 보호 작용을 할 뿐 아니라 염증 반응을 약화시키기도 한다 (Willis *et al.*, 1996). Heme-HO-1 system의 산물인 biliverdin이 부종의 형성, 백혈구의 흡착과 이동 그리고 IL-6와 IL-1β 같은 pro-inflammatory cytokines의 생성을 감소시키는 것으로 보고되고 있다 (Nakao *et al.*, 2004). 게다가 HO-1과 cyclooxygenase (COX) 또는 HO-1과 NO 사이의 상호 작용도 보고되었다 (Quan *et al.*, 2002; Alcaraz *et al.*, 2003; Vicente *et al.*, 2003). CO와 biliverdin 같은 HO-1의 heme 분해에 따른 catabolic 산물들이나 HO-1에 의한 signal transduction pathway의 조절은 COX의 활성 및 그 발현과 NO의 생성을 통제할 수 있으며, 이로 인해 염증 반응을 예방할 수 있다 (Ryter *et al.*, 2002; Li Volti *et al.*, 2003; Vicente *et al.*, 2003; Nakao *et al.*, 2004). CO와 biliverdin은 HO-1의 산물로서 항염증, anti-apoptosis 기능을 갖는다 (Brouard *et al.*, 2000; Otterbein *et al.*, 2000; Naito *et al.*, 2004). CO는 혈소판 응집을 억제하고 vascular tone을 통제하며 smooth muscle의 증식을 억제하는 효능이 있다 (Ryter *et al.*, 2004). Bilirubin으로 전환되는 biliverdin도 iNOS와 COX-2는 물론 inflammatory cytokines인 IL-

6와 IL-1 β 의 mRNA 발현을 감소시켜 항염증 효과를 일으킨다 (Nakao *et al.*, 2004). 이처럼 HO-1은 산화적 스트레스나 조직의 염증 손상과 관련된 다양한 질병/상태들에 대해 보호 작용을 갖는다.

동맥경화 (atherosclerosis)에서 HO-1이 매개하는 세포 보호 작용은 연구가 활발한 영역 중의 하나이다. Zhang 등 (2002)은 vascular muscle cells에 HO-1을 주입하면 H₂O₂에 의한 세포 사멸과 그 생화학적 지표인 lactate dehydrogenase 유출에 대해 저항성을 갖게 됨을 확인하였다. 게다가, 이 HO-1이 주입된 세포들이 성장 억제 능력을 보임에 따라 HO-1의 과발현이 부분적으로는 산화적 손상에 대한 세포 보호 작용과 함께 세포 증식 억제 효과를 통해 동맥경화의 위험을 잠재적으로 감소시킬 수 있다는 것을 알 수 있다. 혈관 보호 작용에 있어 HO-1 유도의 연관성이 Yet 등 (Yet *et al.*, 2003)에 의해 제시되었다. 이 연구에 따르면 apolipoprotein E-deficient mice에서 adenovirus에 의한 HO-1 유전자 전이가 atherosclerosis의 발달을 억제하였다. 게다가, HO-1 유전자의 ectopic expression은 독감 바이러스에 감염된 쥐에서 급성 폐 손상을 치료하는 효과를 나타내었다 (Hashiba *et al.*, 2001; Dore, 2002).

HO-1의 anti-apoptotic 작용은 심근비대 (cardiac hypertrophy)를 억제하는데 기여하는 것으로 보인다. HO-1의 ectopic expression은 CO와 biliverdin이 HO-1의 성장 억제 효과와 흡사하게 작용하는 것과 동시에, cardiac myocytes에서 endothelin-1에 의한 비대화를 의미 있는 정도로 억제하였다 (Tongers *et al.*, 2004). 이러한 결과들은 HO-1이 심근비대를 예방함에 있어서 중요한 역할을 할 것을 강력히 시사하고 있다.

Ischemia reperfusion (I/R)에 의한 손상은 장기이식 후 초기와 후기 이식 기능에 영향을 끼치는 다인성의 항원의 존적 과정이다. I/R의 복잡한 메커니즘은 세포손상과 이식거부반응으로 이르게 되는 neutrophil의 축적, pro-inflammatory mediator와 cytokines의 방출에 의한 것으로 생각된다. HO-1은 이 과정 중에서 활성화되는 가장 중요한 cytoprotective proteins 중의 하나이다. HO-1은 여러 개의 세포 내 cytoprotective signaling pathways를 강화할 수 있기 때문에 HO-1은 장기 이식에 있어 새로운 치료 타깃으로 고려할 수 있을 것이다. HO-1 유제제인 cobalt protoporphyrin을 처리하거나 adenoviral vector를 이용해 HO-1 유전자를 주입하면, steatotic rat liver에서 I/R 손상을 막을 수 있었다 (Amersi *et al.*, 1999). 허혈 후 재관류를 시킨 *ex vivo* rat model에서 구조적, 기능적 간 손상 척도들의 분석으로 평가된 간 I/R 상해의 심각성도 외부에서 주입된 CO에 의해 현저히 약화되었다 (Amersi *et al.*, 2002). p38 MAPK

signaling pathway는 CO가 I/R 손상을 막는 주요 통제 메커니즘으로 제시되어 왔다. 게다가 HO-1의 억제는 I/R에 의한 조직 손상 (혈관 저항의 증가, hepatic sinusoidal congestion과 같은)을 증가시켰다 (Amersi *et al.*, 2002). 아마도 외인성 CO의 투여가 I/R 손상을 예방하거나 완화하는데 잠재적인 효과를 지닌 것 같으며, 따라서 이식을 위한 간 제공자를 늘리는데 도움을 줄 것이다. 조직을 저농도의 산화제로 전처리하는 것은 adaptive response로서 HO-1을 유도한다. 그리고 이 전처리 후에는 같은 조직을 상대적으로 고농도의 산화제에 노출시키더라도 유해한 영향이 나타나지 않았다 (Takahashi *et al.*, 2004). HO-1 유도의 이러한 면에 초점을 맞춘 연구들이 *ex vivo* (Amersi *et al.*, 2002) 그리고 *in vivo* rat liver models (Wang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005)과 같은 다양한 I/R 연구에서 설명되어졌다. 덧붙여, HO-1의 자극 또는 억제가 산화제 전처리로 매개된 cytoprotection을 각각 증가시키거나 무력화한다 (Li *et al.*, 2000; Lang *et al.*, 2005).

최근에는 HO-1이 산화제 위험에 노출된 neuron에 대한 근본적인 방어 메커니즘을 구축할 수 있다는 이유로 neuroprotection에서의 HO-1의 역할이 상당한 관심을 끌고 있다. HO-1은 vasoactive molecule인 CO와 강력한 항산화제인 bilirubin을 생성해 냄으로써 산화적 스트레스에 의한 뇌 손상에 대해 보호기능을 할 수 있다. 치매 (Alzheimer's disease)는 β -amyloid로 유도된 산화적 손상이 주된 발병요인이라고 알려져 왔다. Amyloid 전구체 단백질과 HO-1 단백질의 상호작용은 HO-1 활성의 억제 (neuroprotection의 실패) 그리고 뒤이어 신경세포 사멸 (neuronal cell death)을 일으킨다 (Takahashi *et al.*, 2000). Huang 등 (Huang *et al.*, 2005)은 HO-1 억제제인 tin protoporphyrin을 복막에 주사하면 rat의 kainate-induced excitotoxic hippocampal injury에서 neurons이 대조군보다 더 적게 생존함을 보였다. 게다가 homozygous HO-1 결핍 마우스로부터 얻은 척수 motor neuron과 신경근의 1차 배양세포가 HO-1이 발현된 세포보다 NO에 의한 세포독성에 더 민감했다 (Bishop *et al.*, 2004). 이로써 HO-1이 NO가 매개하는 신경독성에 대한 방어의 최전방에 있음을 알 수 있다.

산화적 스트레스는 유전적 그리고 epigenetic 변화 (돌연변이 유발, 발암물질에 의한 DNA adduct 형성, oncogene과 tumor 억제 유전자가 비정상적으로 기능함, 정상적인 세포 신호전달 기능의 장애 등)를 통한 발암과정의 여러 단계에서 병인 (etiologic factor)으로 작용할 수 있다 (Surh, 2003). 제 1상 약물대사 효소 (Phase I xenobiotic metabolizing enzymes)들은 발암물질의 대사적 활성화에도 매우 중요한 역할을 한다. HO-1이 Phase I 효소들을 억제하는

것으로 보고되고 있기 때문에 (Langouet *et al.*, 2000; Munday and Munday, 2004), 특히 tumor initiation 단계에서, HO-1 유도는 아마도 화학적 암예방 (chemoprevention)과 연관되어 있을 수 있을 것이다. 항산화 효소로서의 HO-1의 유도는 세포의 산화적 부담을 감소시켜줄 수 있고 그럼으로써 암의 개시 (tumor initiation)를 막는다. 염증이 종양 촉진 (tumor promotion)과 밀접하게 관련되어 있기 때문에 (Balkwill and Mantovani, 2001; Clevers, 2004; Marx, 2004) HO-1이나 그 생성물 (CO와 biliverdin)들의 항염증 효과가 HO-1 유도를 통한 화학적 암예방에 기여할 것이다.

다양한 종양에서 HO-1의 발현이 증가되어 있음을 관찰되었다 (Fang *et al.*, 2004). 사실 HO-1은 정상세포 뿐 아니라 종양세포에서도 항산화 및 antiapoptotic 능력을 발휘해서 종양세포의 성장을 돋기도 한다 (Fang *et al.*, 2004). 더군다나 HO-1은 혈관생성에도 중요한 역할을 하는 것으로 나타났는데, 이는 HO-1의 발현 및 그 부산물인 CO가 주요 혈관 생성 물질인 vascular endothelial growth factor 합성을 강화시키고 모세혈관의 형성을 증대시킴으로써 이루어진다 (Dulak *et al.*, 2004).

이러한 사실을 바탕으로 HO-1 억제제인 zinc protoporphyrin (ZnPP)를 사용해 종양 내 HO-1 활성을 억제하는 것이 새로운 항암 치료의 전략이 될 수 있다는 가설을 세울 수 있다 (Fang *et al.*, 2004). HO-1이나 그의 부산물 (bilirubin과 CO)은 종양 세포가 숙주 세포에서 발생되는 활성 산소종으로부터 보호받을 수 있도록 해주고 따라서 종양 세포는 성장을 계속 할 수 있다. 하지만, superoxide dismutase, catalase 그리고 glutathione peroxidase 등 종양 세포에 존재하는 HO-1이외의 다른 항산화 효소 시스템들은 매우 저하되는 것으로 나타났다 (Yamanaka and Deamer, 1974; Sato *et al.*, 1992; Hasegawa *et al.*, 2002). 즉, HO-1이 종양세포에서 주 항산화 시스템인 것으로 보인다. 그러므로 종양세포에서 ZnPP를 이용한 HO-1 활성의 억제는 종양에 활성 산소종 생산 증가를 일으키고 이로 인해 종양세포는 apoptosis를 통해 죽게 될 것이다. Doi 등 (Doi *et al.*, 1999)에 따르면, AH136B hepatoma solid tumor를 가진 rat에 tumor-feeding artery를 통해 ZnPP를 투여하면 종양의 성장이 현저하게 억제된다고 한다.

최근에는 수용성 ZnPP 유도체인 PEG-ZnPP가 본래 ZnPP로서의 HO-1 억제 능력을 가질 뿐만 아니라 고형암에 대한 drug targeting 측면에서 약물학적인 특징도 향상시키는 것으로 보였다. 인간 대장암 SW480 세포를 PEG-ZnPP로 처리하면 용량 의존적으로 세포 내 산화적 스트레스가 증가하고 결국에는 apoptosis에 이르게 된다 (Sahoo *et al.*, 2002). HO-1 발현을 억제하기 위해 HO-1에 대한 siRNA를 주입한

SW840 세포도 비슷한 apoptosis 유도를 나타내었다 (Fang *et al.*, 2003). 더 중요한 것은 sarcoma S-180을 지닌 mice에 PEG-ZnPP를 처리하면 종양 성장이 극적으로 억제되었으며 이런 현상은 처리과정이 중지된 이후에도 계속되었다. 이런 결과는 기존의 항종양제인 doxorubicin과 비교할 만하고 오히려 더 뛰어난 효과이다. Doxorubicin의 S-180에 대한 최대 억제는 72% (Matsushita *et al.*, 1985)였고 PEG-ZnPP는 부작용도 거의 없이 80% 이상이었다 (Fang *et al.*, 2003).

더 나아가 최근의 한 연구는 PEG-ZnPP가 기존의 다른 항암제와 함께 사용될 경우 종양세포의 화학요법에 대한 반응성을 강화시킬 수 있다는 것도 보여주었다 (Fang *et al.*, 2004). 많은 기존의 항암제들 (doxorubicin이나 camptothecin 같은)은 유독한 활성 산소종의 생성을 유도함으로써 항종양 효과를 낸다고 알려져 있다 (Simizu *et al.*, 1998). 따라서 암세포의 경우 HO-1을 억제하여 활성 산소종에 의한 apoptosis에 더 약하게 하는 것은 이런 활성 산소종을 생성해 효과를 내는 항암제들의 약효를 배가시켜줄 수 있을 것이다.

화학적 암예방의 HO-1 유도 작용 (Introduction of HO-1 by Chemopreventive Agents)

최근 관심을 끌고 있는 암예방 전략의 하나인 화학적 암예방 (chemoprevention)은 천연물이나 합성물질 혹은 이를 혼합물을 사용하여 단계별암 과정을 막거나, 되돌리고, 또는 지연시키는 것으로 정의된다 (Surh, 2003). 산화적 스트레스와 염증으로 인한 조직 손상은 별암과정과 밀접한 관계가 있다. HO-1 생산물의 항산화와 항염증 효과를 뒷받침하는 증거들이 늘어가는 것을 토대로, 천연물이나 합성물질에 의한 이 효소의 발현이나 그 촉매 능력의 유도는 단계의 별암과정을 억제하는 효과적인 전략일 수 있다.

화학적 암예방 효능을 갖는 식물 생리 화합물들 (Chemopreventive phytochemicals)

Curcumin, caffeic acid phenethyl ester (CAPE), sulforaphane, carnosol 그리고 resverterol을 포함하는 매우 다양한 식물성 화합물들은 중요한 화학 암예방제로서 인식되어 왔다. HO-1 유도를 통한 세포보호, 항염증, 항산화 효과들은 아마도 이들 식물성 화합물들이 보유한 화학암예방 효능에 기여할 것이다.

Curcumin 건조시킨 강황 (*Curcuma longa* Linn, Zingiberaceae)의 줄기뿌리로부터 추출한 향신료의 주 활성성분인 curcumin은 다양한 염증상태와 다른 질환들을 치료하는데

사용되어 왔다. 사실, curcumin은 효과적인 항염증, 항산화, 항암 효능을 가졌다고 보고되어 왔다. 그 구조에 친전자적 중심부가 존재하기 때문에 curcumin은 Micheal 반응의 acceptor로 작용할 수 있고 phase II 해독화 효소들의 활성을 유도할 수 있다 (Dinkova-Kostova *et al.*, 2001). 최근, 저농도의 curcumin으로 HO-1 발현을 유도하는 것이 그 세포 보호 효과에 기여하고 저산소증 상태에서 내피세포가 산화적 세포 손상에 대해 저항하는 능력을 크게 강화해주는 것으로 보고되었다 (Motterlini *et al.*, 2000). 저산소증이 curcumin의 존재 하에서 보다 빠르고 강하게 HO-1 mRNA 발현을 유도하였기 때문에, 이 작용은 전사 단계에서 일어났다고 할 수 있다. 장기와 조직에서 curcumin이 산화적인 손상에 대한 반응으로서 세포 내 방어 체계를 활성화시키는 보강제로서 사용될 수 있다고 생각할 만하다. Curcumin이 암세포의 성장을 억제할 수 있는 반면에 (Aggarwal *et al.*, 2004; Koo *et al.*, 2004), 정상세포에서는 HO-1 발현과 활성을 유도할 수 있으며 (Motterlini *et al.*, 2000; Scapagnini *et al.*, 2002), 그럼으로써 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상과 이어지는 발암과정의 개시를 차단할 수 있다. Curcumin은 폐지 신장 상피세포 (LLC-PK₁)와 랙드의 신장 상피세포에서 p38 MAPK의 활성화를 통해 매개된다고 여겨지는 Nrf2-Keap1 복합체의 분리와 Nrf2와 ARE의 결합을 촉진시켜 HO-1 유전자 발현을 유도했다 (Balogun *et al.*, 2003). 게다가, curcumin을 인간 신장 proximal tubule cell에 처리하면 어느 정도 NF-κB signaling pathway의 활성화를 통해서 HO-1 mRNA와 단백질의 발현이 유도되었다 (Hill-Kapturczak *et al.*, 2001).

CAPE 꿀벌의 propolis에서 추출한 polyphenolic 화합물인 caffeic acid phenethyl ester (CAPE)는 혈관 내피세포, neuronal cell 그리고 신장 상피세포에서 HO-1을 유도하는 것으로 보고되고 있다 (Scapagnini *et al.*, 2002; Balogun *et al.*, 2003). Balogun 등 (2003)은 CAPE가 Nrf2-Keap1 복합체의 분리를 유도해서 Nrf2가 내재하는 HO-1 ARE에 결합하는 것을 증가시킴으로써 HO-1 유전자의 발현을 자극한다고 보고했다. Curcumin과 비슷하게 CAPE도 cysteine thiols 같은 Keap1에 존재하는 친핵체와 선택적으로 Micheal adduct를 형성할 수 있고, 그래서 Nrf2의 핵 안으로의 이동을 촉진시키는 친전자적인 α,β-unsaturated carbonyl기를 가지고 있다 (Dinkova-Kostova *et al.*, 2001).

Sulforaphane 십자화과 식물의 한 성분인 isothiocyanate sulforaphane은 phase I 효소의 억제와 phase II 효소의 유도를 통해 매개되는 bifunctional 화학적 암예방 효과 때문에 집중적으로 연구되어 왔다 (Langouet *et al.*, 2000; Munday and Munday, 2004). Sulforaphane은 또한 활발히

증식하는 암세포의 apoptosis를 유도하고 cell-cycle 진행을 완화시킬 수 있다 (Singh *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2004). 이 화합물은 또 Nrf2의 ARE로의 결합을 증가시키는데, 이는 HO-1을 포함한 phase II 해독화 유전자 군을 유도하는 결과를 초래한다 (Zhang and Hannink, 2003; Herman-Antosiewicz and Singh, 2004).

naturally occurring organosulfur compounds 마늘에 존재하는 allyl sulfide, diallyl disulfide, diallyl trisulfide 등과 같은 황화합물들 (organosulfur compounds)은 세포보호 활성과 화학암예방 활성을 가지는 것으로 보여진다 (Herman-Antosiewicz and Singh, 2004). Allyl sulfides는 발암물질의 활성화를 막거나 이미 활성화된 발암물질의 해독화를 촉진시켜 암의 위험을 감소시킨다. 몇 가지 연구들을 통해 마늘에서 유래한 유황 화합물이 발암물질의 대사적 활성화를 억제함으로써 화학물질에 의한 독성과 발암을 예방한다는 것이 밝혀졌다 (Milner, 2001; Yang *et al.*, 2001). 덧붙여, 유기 황 화합물에 의한 항산화 및 phase II 해독화 효소들의 유도가 최근 보고되고 있다 (Guyonnet *et al.*, 1999; Sheen *et al.*, 1999). Allyl sulfides가 친전자체로 작용할 sulfone 유도체를 형성하는 대사적 전환을 거치기 때문에 (Germain *et al.*, 2003), 유기 황 화합물은 Nrf2-Keap1 복합체를 표적으로 삼고, 그래서 Nrf2가 조절하는 유전자 전사와 ARE 활성화를 유도할 것으로 생각된다. 이 가설을 뒷받침하듯, Chen 등 (Chen *et al.*, 2004)은 최근에 human hepatoma (HepG2) cell을 다양한 유기 황 화합물로 처리한 결과 HO-1의 유도를 유발하는 Nrf2의 활성화가 이루어졌다고 보고하였다. 이와 비슷하게, Gong 등 (Gong *et al.*, 2004)은 인체간암세포주 (HepG2 cells)에서 diallyl sulfide가 Nrf2가 매개하는 HO-1 발현을 유도함을 보고하였다. HepG2 세포 주에서 diallyl trisulfide가 유도한 ARE 활성화는 MAPKs나 PKC가 아니라 Ca²⁺ 의존적인 signaling을 통해 매개되지만, 동일한 세포주에서 diallyl sulfide는 ERK와 p38 MAPK의 활성화를 유도하였고 (Chen *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 2004) 이는 활성 산소종 의존적이었으며, 이를 통해 Nrf2의 핵 내 이동과 HO-1 유전자 발현이 촉진되었다. 이처럼 MAPKs를 통한 Nrf2와 HO-1 유도의 활성화에 미치는 마늘유래 황화합물들의 영향의 차이는 유황 (sulfur)원자의 수와 alkyl side chain의 길이 같은 구조적 차이 (모체 화합물은 물론 그들의 활성 대사산물에도 다양한 정도의 친전자성을 부여하는)에 기인하는 듯하다.

miscellaneous phytochemicals 저농도의 resveratrol은 인간 대동맥 smooth muscle 세포에서 시간·농도 의존적으로 HO-1을 유도했고 이는 NF-κB signaling pathway의 활성화를 통해 매개되었다. 비록 상대적으로 고농도 ($\geq 20 \mu\text{M}$)의

resveratrol은 다른 세포에서 NF-κB signaling을 억제하긴 하지만, 이전의 연구들에서는 상대적으로 저농도로 이 화합물을 처리하면 pro-oxidant 효과를 낸다는 것을 제시하였다 (Ahmad *et al.*, 2003). 로즈마리에 있는 항산화제인 carnosol에 의한 HO-1의 유도와 그 mRNA 전사는 PI3K/Akt signaling pathway를 통해 매개된다고 보고되었다 (Martin *et al.*, 2004). 최근에 Foresti 등 (Foresti *et al.*, 2005)은 *Plantago*에서 추출된 성분인 rosolic acid가 소의 동맥 내피세포에서 HO-1의 발현과 활성을 모두 유도함을 보고하였다. 이 연구에 따르면, MAPKs는 단지 작은 역할만 하는 반면에, 세포 내·외의 thiols level의 증가가 rosolic acid에 의해 유도되는 HO-1 발현을 크게 감소시켰다.

합성 항산화 화합물 (Synthetic antioxidants)

몇 가지 합성 phase II 효소 유도 화합물 (oltipraz와 related dithiolethiones)과 특정형태의 종양 발생에 대한 위험을 감소시키는 것으로 나타난 COX-2 억제제들이 HO-1의 발현과 활성을 조절한다. COX-2 선택적인 억제제는 NO에 의해 유도되는 HO-1 발현을 조절하는 것으로 생각되어진다. RAW264.7 cell을 COX-2 선택적인 억제제인 SC58125 그리고 NO를 방출하는 spermine nonoate과 함께 배양하면서 주로 전사 단계의 HO-1 유도에서 시너지 효과를 일으켰다 (Alcaraz *et al.*, 2001). NO에 의한 HO-1의 유도와 COX-2 억제제에 의한 그것의 강화는 아마도 염증 반응을 약화시키는 역할을 할 것이다. Vicente 등 (Vicente *et al.*, 2003)은 mouse의 air pouch model에 zymosan을 주입하면 HO-1 단백질의 발현이 유도됨을 보고하였고 또한 hemin을 주사한 마우스로부터 얻은 peritoneal macrophages에서 HO-1발현이 COX-2 발현의 억제와 prostaglandin E₂ level 억제를 수반하면서 증가됨을 관찰하였다. 게다가 indomethacin의 존재 하에서 IL-1β는 강하게 HO-1 mRNA를 유도하였다 (Tetsuka *et al.*, 1995). 항암효능과 HO-1 유도 사이의 직접적인 관계가 밝혀지진 않았지만 암예방 효능을 갖는 COX 억제제에 의한 HO-1 발현의 증가는 HO-1 유도체들이 화학적 암예방 효과를 나타낼 수 있음을 시사한다.

Oltipraz와 related dithiolethiones는 HO-1을 포함하는 발암물질 해독화 유전자와 항산화 유전자의 발현을 강화시킴으로써 그들의 화학적 암예방 능력을 발휘한다 (Kensler, 1997; Roebuck *et al.*, 2003). 실험동물에서 oltipraz는 carbon tetrachloride, acetaminophen, allylalcohol 그리고 aflatoxin에 의해 유도된 급성 독성에 대해 보호 작용을 나타내었다 (Kwak *et al.*, 2004). Primiano 등 (Primiano *et al.*, 1996)에 따르면, 1,2-dithiole-3-thione를 랫드에 처리하면 증가된 HO-1 단백질만큼 간에서의 HO-1 활성이 증가되

는 것으로 나타났다. Oltipraz와 related thiols의 화학적 암예방 효과는 화학물질의 활성 대사산물 형성을 감소시키거나 그들의 해독화를 강화하는데 기인한다 (Kwak *et al.*, 2004).

V. 결 론

세포 방어 메커니즘에서 가장 중요한 구성원 중의 하나로서의 HO-1의 역할을 뒷받침하는 논문들이 증가하고 있다. 더 나아가, AP-1, NF-κB, Nrf2 그리고 BVR에 의한 전사 조절을 통한 HO-1의 유도는 이들 전사인자들이 세포 산화 환원 항상성을 유지하는데 있어 핵심적인 역할을 한다는 것을 의미한다. 염증반응 중에 증가하는 산화적 혹은 질소적 스트레스는 이에 대응하기 위한 HO-1 유도를 동반한다. 게다가, 항산화 효소로서 HO-1은 DNA의 산화적 손상도 예방할 수 있다. 그럼으로써 발암의 개시를 막고, 산화적 혹은 염증 유발성의 조직 손상과 연관된 암의 촉진과정을 억제한다. 따라서 HO-1의 유도는 화학적 암예방 연구를 위한 가장 중요한 목표 중의 하나로 인식되고 있다. 한편, HO-1은 일부 종양세포의 주요 항산화 메커니즘으로 작용해 종양세포 성장을 돋기도 한다. 따라서 이 경우에는 HO-1의 활성을 억제하는 것을 종양세포 성장을 막는 anti-tumor 치료의 한 방법으로도 생각할 수 있다.

VI. 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 과학기술부 바이오식품소재 기술개발사업 및 서울대학교 약학대학 종합약학연구소의 연구비지원으로 수행되었으며 이에 감사드린다.

참 고 문 헌

- Aggarwal, S., Takada, Y., Singh, S., Myers, J.N., and Aggarwal, B.B. (2004) Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor-kappaB signaling. *Int. J. Cancer* **111**, 679-92.
- Ahmad, K.A., Clement, M.V., and Pervaiz, S. (2003) Pro-oxidant activity of low doses of resveratrol inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1010**, 365-73.
- Ahmad, Z., Salim, M., and Maines, M.D. (2002) Human biliverdin reductase is a leucine zipper-like DNA-binding protein and functions in transcriptional activation of heme oxygenase-1 by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **277**, 9226-32.
- Alam, J., Cai, J., and Smith, A. (1994) Isolation and characterization of the mouse heme oxygenase-1 gene. Distal 5' sequences are required for induction by heme or heavy metals. *J. Biol. Chem.* **269**, 1001-9.

- Alam, J. and Den, Z. (1992) Distal AP-1 binding sites mediate basal level enhancement and TPA induction of the mouse heme oxygenase-1 gene. *J. Biol. Chem.* **267**, 21894-900.
- Alam, J., Stewart, D., Touchard, C., Boinapally, S., Choi, A.M., and Cook, J.L. (1999) Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J. Biol. Chem.* **274**, 26071-8.
- Alam, J., Wicks, C., Stewart, D., Gong, P., Touchard, C., Otterbein, S., Choi, A.M., Burow, M.E., and Tou, J. (2000) Mechanism of heme oxygenase-1 gene activation by cadmium in MCF-7 mammary epithelial cells. Role of p38 kinase and Nrf2 transcription factor. *J. Biol. Chem.* **275**, 27694-702.
- Alcaraz, M.J., Fernandez, P., and Guillen, M.I. (2003) Anti-inflammatory actions of the heme oxygenase-1 pathway. *Curr. Pharm. Des.* **9**, 2541-51.
- Alcaraz, M.J., Habib, A., Creminon, C., Vicente, A.M., Lebret, M., Levy-Toledano, S., and Maclouf, J. (2001) Heme oxygenase-1 induction by nitric oxide in RAW 264.7 macrophages is upregulated by a cyclo-oxygenase-2 inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta* **1526**, 13-6.
- Alvarez-Maqueda, M., El Bekay, R., Alba, G., Monteseirin, J., Chacon, P., Vega, A., Martin-Nieto, J., Bedoya, F.J., Pintado, E., and Sobrino, F. (2004) 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 induces heme oxygenase-1 gene expression in a reactive oxygen species-dependent manner in human lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **279**, 21929-37.
- Amersi, F., Buelow, R., Kato, H., Ke, B., Coito, A.J., Shen, X.D., Zhao, D., Zaky, J., Melinek, J., Lassman, C.R., Kolls, J.K., Alam, J., Ritter, T., Volk, H.D., Farmer, D.G., Ghobrial, R.M., Busuttil, R.W., and Kupiec-Weglinski, J.W. (1999) Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *J. Clin. Invest.* **104**, 1631-9.
- Amersi, F., Shen, X.D., Anselmo, D., Melinek, J., Iyer, S., Southard, D.J., Katori, M., Volk, H.D., Busuttil, R.W., Buelow, R., and Kupiec-Weglinski, J.W. (2002) Ex vivo exposure to carbon monoxide prevents hepatic ischemia/reperfusion injury through p38 MAP kinase pathway. *Hepatology* **35**, 815-23.
- Angel, P. and Karin, M. (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta* **1072**, 129-57.
- Attuwaybi, B.O., Kozar, R.A., Moore-Olufemi, S.D., Sato, N., Hassoun, H.T., Weisbrodt, N.W., and Moore, F.A. (2004) Heme oxygenase-1 induction by hemin protects against gut ischemia/reperfusion injury. *J. Surg. Res.* **118**, 53-7.
- Balkwill, F. and Mantovani, A. (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* **357**, 539-45.
- Balogun, E., Hoque, M., Gong, P., Killeen, E., Green, C.J., Foresti, R., Alam, J., and Motterlini, R. (2003) Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem. J.* **371**, 887-95.
- Benbrook, D.M. and Jones, N.C. (1990) Heterodimer formation between CREB and JUN proteins. *Oncogene* **5**, 295-302.
- Bishop, A., Yet, S.F., Lee, M.E., Perrella, M.A., and Demple, B. (2004) A key role for heme oxygenase-1 in nitric oxide resistance in murine motor neurons and glia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **325**, 3-9.
- Blank, V. and Andrews, N.C. (1997) The Maf transcription factors: regulators of differentiation. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 437-41.
- Breen, A.P. and Murphy, J.A. (1995) Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic. Biol. Med.* **18**, 1033-77.
- Brouard, S., Otterbein, L.E., Anrather, J., Tobiasch, E., Bach, F.H., Choi, A.M., and Soares, M.P. (2000) Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J. Exp. Med.* **192**, 1015-26.
- Camhi, S.L., Alam, J., Wiegand, G.W., Chin, B.Y., and Choi, A.M. (1998) Transcriptional activation of the HO-1 gene by lipopolysaccharide is mediated by 5' distal enhancers: role of reactive oxygen intermediates and AP-1. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **18**, 226-34.
- Chan, K., Han, X.D., and Kan, Y.W. (2001) An important function of Nrf2 in combating oxidative stress: detoxification of acetaminophen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 4611-6.
- Chan, K. and Kan, Y.W. (1999) Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 12731-6.
- Chen, C., Pung, D., Leong, V., Hebbar, V., Shen, G., Nair, S., Li, W., and Kong, A.N. (2004) Induction of detoxifying enzymes by garlic organosulfur compounds through transcription factor Nrf2: effect of chemical structure and stress signals. *Free Radic. Biol. Med.* **37**, 1578-90.
- Chen, G.G., Liu, Z.M., Vlantis, A.C., Tse, G.M., Leung, B.C., and van Hasselt, C.A. (2004) Heme oxygenase-1 protects against apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha and cycloheximide in papillary thyroid carcinoma cells. *J. Cell. Biochem.* **92**, 1246-56.
- Chen, K. and Maines, M.D. (2000) Nitric oxide induces heme oxygenase-1 via mitogen-activated protein kinases ERK and p38. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* **46**, 609-17.
- Chin, B.Y., Trush, M.A., Choi, A.M., and Risby, T.H. (2003) Transcriptional regulation of the HO-1 gene in cultured macrophages exposed to model airborne particulate matter. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **284**, L473-80.
- Cho, H.Y., Jedlicka, A.E., Reddy, S.P., Kensler, T.W., Yamamoto, M., Zhang, L.Y., and Kleeberger, S.R. (2002) Role of NRF2 in protection against hyperoxic lung injury in mice. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **26**, 175-82.
- Choi, B.M., Kim, H.J., Oh, G.S., Pae, H.O., Oh, H., Jeong, S., Kwon, T.O., Kim, Y.M., and Chung, H.T. (2002) 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-beta-D-glucose protects rat neuronal cells (Neuro 2A) from hydrogen peroxide-mediated cell death via the induction of heme oxygenase-1. *Neurosci. Lett.* **328**, 185-9.
- Clevers, H. (2004) At the crossroads of inflammation and cancer. *Cell* **118**, 671-4.
- Dhakshinamoorthy, S., Jain, A.K., Bloom, D.A., and Jaiswal, A.K. (2005) Bach1 competes with Nrf2 leading to negative regulation of the antioxidant response element (ARE)-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene expression and induction in response to antioxidants. *J. Biol. Chem.* **280**, 16891-900.

- Dhakshinamoorthy, S., Long, D.J., 2nd and Jaiswal, A.K. (2000) Antioxidant regulation of genes encoding enzymes that detoxify xenobiotics and carcinogens. *Curr. Top. Cell. Regul.* **36**, 201-16.
- Dinkova-Kostova, A.T., Massiah, M.A., Bozak, R.E., Hicks, R.J., and Talalay, P. (2001) Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 3404-9.
- Doi, K., Akaike, T., Fujii, S., Tanaka, S., Ikebe, N., Beppu, T., Shibahara, S., Ogawa, M., and Maeda, H. (1999) Induction of haem oxygenase-1 nitric oxide and ischaemia in experimental solid tumours and implications for tumour growth. *Br. J. Cancer* **80**, 1945-54.
- Dore, S. (2002) Decreased activity of the antioxidant heme oxygenase enzyme: implications in ischemia and in Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* **32**, 1276-82.
- Dulak, J., Loboda, A., Zagorska, A., and Jozkowicz, A. (2004) Complex role of heme oxygenase-1 in angiogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* **6**, 858-66.
- Durante, W., Christodoulides, N., Cheng, K., Peyton, K.J., Sunahara, R.K., and Schafer, A.I. (1997) cAMP induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **273**, H317-23.
- Elbirt, K.K. and Bonkovsky, H.L. (1999) Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role. *Proc. Assoc. Am. Physicians* **111**, 438-47.
- Elbirt, K.K., Whitmarsh, A.J., Davis, R.J., and Bonkovsky, H.L. (1998) Mechanism of sodium arsenite-mediated induction of heme oxygenase-1 in hepatoma cells. Role of mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **273**, 8922-31.
- Enomoto, A., Itoh, K., Nagayoshi, E., Haruta, J., Kimura, T., O'Connor, T., Harada, T., and Yamamoto, M. (2001) High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. *Toxicol. Sci.* **59**, 169-77.
- Fang, J., Akaike, T., and Maeda, H. (2004) Antiapoptotic role of heme oxygenase (HO) and the potential of HO as a target in anticancer treatment. *Apoptosis* **9**, 27-35.
- Fang, J., Sawa, T., Akaike, T., Akuta, T., Sahoo, S. K., Khaled, G., Hamada, A., and Maeda, H. (2003) In vivo antitumor activity of pegylated zinc protoporphyrin: targeted inhibition of heme oxygenase in solid tumor. *Cancer Res.* **63**, 3567-74.
- Fang, J., Sawa, T., Akaike, T., Greish, K., and Maeda, H. (2004) Enhancement of chemotherapeutic response of tumor cells by a heme oxygenase inhibitor, pegylated zinc protoporphyrin. *Int. J. Cancer* **109**, 1-8.
- Foresti, R., Hoque, M., Monti, D., Green, C.J., and Motterlini, R. (2005) Differential activation of heme oxygenase-1 by chalcones and rosolic acid in endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **312**, 686-93.
- Germain, E., Chevalier, J., Siess, M.H., and Teyssier, C. (2003) Hepatic metabolism of diallyl disulphide in rat and man. *Xenobiotica* **33**, 1185-99.
- Gong, P., Hu, B., and Cederbaum, A.I. (2004) Diallyl sulfide induces heme oxygenase-1 through MAPK pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* **432**, 252-60.
- Gong, P., Hu, B., Stewart, D., Ellerbe, M., Figueroa, Y.G., Blank, V., Beckman, B.S., and Alam, J. (2001) Cobalt induces heme oxygenase-1 expression by a hypoxia-inducible factor-independent mechanism in Chinese hamster ovary cells: regulation by Nrf2 and MafG transcription factors. *J. Biol. Chem.* **276**, 27018-25.
- Guyonnet, D., Siess, M.H., Le Bon, A.M., and Suschetet, M. (1999) Modulation of phase II enzymes by organosulfur compounds from allium vegetables in rat tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **154**, 50-8.
- Hagmeyer, B.M., Konig, H., Herr, I., Offringa, R., Zantema, A., van der Eb, A., Herrlich, P., and Angel, P. (1993) Adenovirus E1A negatively and positively modulates transcription of AP-1 dependent genes by dimer-specific regulation of the DNA binding and transactivation activities of Jun. *Embo J.* **12**, 3559-72.
- Hanze, J., Eul, B.G., Savai, R., Krick, S., Goyal, P., Grimminger, F., Seeger, W., and Rose, F. (2003) RNA interference for HIF-1alpha inhibits its downstream signalling and affects cellular proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **312**, 571-7.
- Hasegawa, Y., Takano, T., Miyauchi, A., Matsuzuka, F., Yoshida, H., Kuma, K., and Amino, N. (2002) Decreased expression of glutathione peroxidase mRNA in thyroid anaplastic carcinoma. *Cancer Lett.* **182**, 69-74.
- Hashiba, T., Suzuki, M., Nagashima, Y., Suzuki, S., Inoue, S., Tsuburai, T., Matsuse, T., and Ishigatubo, Y. (2001) Adenovirus-mediated transfer of heme oxygenase-1 cDNA attenuates severe lung injury induced by the influenza virus in mice. *Gene Ther.* **8**, 1499-507.
- Herdegen, T. and Leah, J.D. (1998) Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res. Rev.* **28**, 370-490.
- Herman-Antosiewicz, A. and Singh, S.V. (2004) Signal transduction pathways leading to cell cycle arrest and apoptosis induction in cancer cells by Allium vegetable-derived organosulfur compounds: a review. *Mutat. Res.* **555**, 121-31.
- Hill-Kapturczak, N., Thamilselvan, V., Liu, F., Nick, H. S., and Agarwal, A. (2001) Mechanism of heme oxygenase-1 gene induction by curcumin in human renal proximal tubule cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **281**, F851-9.
- Huang, E., Ong, W.Y., Go, M.L., and Garey, L.J. (2005) Heme oxygenase-1 activity after excitotoxic injury: immunohistochemical localization of bilirubin in neurons and astrocytes and deleterious effects of heme oxygenase inhibition on neuronal survival after kainate treatment. *J. Neurosci. Res.* **80**, 268-78.
- Immenschuh, S., Kietzmann, T., Hinke, V., Wiederhold, M., Katz, N., and Muller-Eberhard, U. (1998) The rat heme oxygenase-1 gene is transcriptionally induced via the protein kinase A signaling pathway in rat hepatocyte cultures. *Mol. Pharmacol.* **53**, 483-91.
- Ishii, T., Itoh, K., Takahashi, S., Sato, H., Yanagawa, T., Katoh, Y., Bannai, S., and Yamamoto, M. (2000) Transcription factor

- Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J. Biol. Chem.* **275**, 16023-9.
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., and Nabeshima, Y. (1997) An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**, 313-22.
- Itoh, K., Mochizuki, M., Ishii, Y., Ishii, T., Shibata, T., Kawamoto, Y., Kelly, V., Sekizawa, K., Uchida, K., and Yamamoto, M. (2004) Transcription factor Nrf2 regulates inflammation by mediating the effect of 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin j(2). *Mol. Cell. Biol.* **24**, 36-45.
- Jaiswal, A.K. (2000) Regulation of genes encoding NAD (P) H:quinone oxidoreductases. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 254-62.
- Jaiswal, A.K. (2004) Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic. Biol. Med.* **36**, 1199-207.
- Jozkowicz, A., Huk, I., Nigisch, A., Weigel, G., Weidinger, F., and Dulak, J. (2002) Effect of prostaglandin-J(2) on VEGF synthesis depends on the induction of heme oxygenase-1. *Antioxid. Redox Signal.* **4**, 577-85.
- Karin, M., Liu, Z., and Zandi, E. (1997) AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 240-6.
- Kensler, T.W. (1997) Chemoprevention by inducers of carcinogen detoxication enzymes. *Environ. Health. Perspect.* **105 Suppl 4**, 965-70.
- Kim, E.H., Kim, D.H., Na, H.K., and Surh, Y.J. (2004) Effects of cyclopentenone prostaglandins on the expression of heme oxygenase-1 in MCF-7 cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1030**, 493-500.
- Kitamuro, T., Takahashi, K., Ogawa, K., Udon-Fujimori, R., Takeda, K., Furuyama, K., Nakayama, M., Sun, J., Fujita, H., Hida, W., Hattori, T., Shirato, K., Igarashi, K. and Shibahara, S. (2003) Bach1 functions as a hypoxia-inducible repressor for the heme oxygenase-1 gene in human cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 9125-33.
- Koo, J.Y., Kim, H.J., Jung, K.O., and Park, K.Y. (2004) Curcumin inhibits the growth of AGS human gastric carcinoma cells in vitro and shows synergism with 5-fluorouracil. *J. Med. Food* **7**, 117-21.
- Kravets, A., Hu, Z., Miralem, T., Torno, M.D., and Maines, M.D. (2004) Biliverdin reductase, a novel regulator for induction of activating transcription factor-2 and heme oxygenase-1. *J. Biol. Chem.* **279**, 19916-23.
- Kronke, G., Bochkov, V.N., Huber, J., Gruber, F., Bluml, S., Furnkranz, A., Kadl, A., Binder, B.R., and Leitinger, N. (2003) Oxidized phospholipids induce expression of human heme oxygenase-1 involving activation of cAMP-responsive element-binding protein. *J. Biol. Chem.* **278**, 51006-14.
- Kutty, R.K. and Maines, M.D. (1984) Hepatic heme metabolism: possible role of biliverdin in the regulation of heme oxygenase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **122**, 40-6.
- Kvietikova, I., Wenger, R.H., Marti, H.H., and Gassmann, M. (1995) The transcription factors ATF-1 and CREB-1 bind constitutively to the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) DNA recognition site. *Nucleic Acids Res.* **23**, 4542-50.
- Kwak, M.K., Wakabayashi, N., and Kensler, T.W. (2004) Chemoprevention through the Keap1-Nrf2 signaling pathway by phase 2 enzyme inducers. *Mutat. Res.* **555**, 133-48.
- Lang, D., Reuter, S., Buzescu, T., August, C., and Heidenreich, S. (2005) Heme-induced heme oxygenase-1 (HO-1) in human monocytes inhibits apoptosis despite caspase-3 up-regulation. *Int. Immunol.* **17**, 155-65.
- Langouet, S., Furge, L.L., Kerriguy, N., Nakamura, K., Guillouzo, A., and Guengerich, F.P. (2000) Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by 1,2-dithiole-3-thione, oltipraz and its derivatives, and sulforaphane. *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 245-52.
- Lavrovsky, Y., Schwartzman, M.L., and Abraham, N.G. (1993) Novel regulatory sites of the human heme oxygenase-1 promoter region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 336-41.
- Lavrovsky, Y., Schwartzman, M.L., Levere, R.D., Kappas, A., and Abraham, N.G. (1994) Identification of binding sites for transcription factors NF-kappa B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 5987-91.
- Lavrovsky, Y., Song, C.S., Chatterjee, B., and Roy, A.K. (2000) Age-dependent increase of heme oxygenase-1 gene expression in the liver mediated by NFkappaB. *Mech. Ageing Dev.* **114**, 49-60.
- Lee, J.S. and Surh, Y.J. (2005) Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Cancer Lett.* **224**, 171-84.
- Lee, P.J., Jiang, B.H., Chin, B.Y., Iyer, N.V., Alam, J., Semenza, G.L., and Choi, A.M. (1997) Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J. Biol. Chem.* **272**, 5375-81.
- Lee, T.S., Chang, C.C., Zhu, Y., and Shyy, J.Y. (2004) Simvastatin induces heme oxygenase-1: a novel mechanism of vessel protection. *Circulation* **110**, 1296-302.
- Lerner-Marmarosh, N., Shen, J., Torno, M.D., Kravets, A., Hu, Z., and Maines, M.D. (2005) Human biliverdin reductase: a member of the insulin receptor substrate family with serine/threonine/tyrosine kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 7109-14.
- Li, N., Venkatesan, M.I., Miguel, A., Kaplan, R., Gujuluva, C., Alam, J., and Nel, A. (2000) Induction of heme oxygenase-1 expression in macrophages by diesel exhaust particle chemicals and quinones via the antioxidant-responsive element. *J. Immunol.* **165**, 3393-401.
- Li, P., Jiang, H., Yang, L., Quan, S., Dinocca, S., Rodriguez, F., Abraham, N.G., and Nasjletti, A. (2004) Angiotensin II induces carbon monoxide production in the perfused kidney: relationship to protein kinase C activation. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **287**, F914-20.
- Li Volti, G., Setta, F., Schwartzman, M.L., Nasjletti, A., and Abraham, N.G. (2003) Heme oxygenase attenuates angiotensin II-mediated increase in cyclooxygenase-2 activity in human femoral endothelial cells. *Hypertension* **41**, 715-9.
- Liu, J.D., Tsai, S.H., Lin, S.Y., Ho, Y.S., Hung, L.F., Pan, S., Ho, F.M., Lin, C.M., and Liang, Y.C. (2004) Thiol antioxidant and

- thiol-reducing agents attenuate 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2-induced heme oxygenase-1 expression. *Life Sci.* **74**, 2451-63.
- Lu, T.H., Shan, Y., Pepe, J., Lambrecht, R.W., and Bonkovsky, H.L. (2000) Upstream regulatory elements in chick heme oxygenase-1 promoter: a study in primary cultures of chick embryo liver cells. *Mol. Cell. Biochem.* **209**, 17-27.
- Maines, M.D. (1984) New developments in the regulation of heme metabolism and their implications. *Crit. Rev. Toxicol.* **12**, 241-314.
- Maines, M.D. (1988) Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *Faseb J.* **2**, 2557-68.
- Maines, M.D., Trakshel, G.M., and Kutty, R.K. (1986) Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J. Biol. Chem.* **261**, 4111-9.
- Martin, D., Rojo, A.I., Salinas, M., Diaz, R., Gallardo, G., Alam, J., De Galarreta, C.M., and Cuadrado, A. (2004) Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol. *J. Biol. Chem.* **279**, 8919-29.
- Marx, J. (2004) Cancer research. Inflammation and cancer: the link grows stronger. *Science* **306**, 966-8.
- Matsushita, Y., Kumagai, H., Yoshimoto, A., Tone, H., Ishikura, T., Takeuchi, T. and Umezawa, H. (1985) Antitumor activities of (2'R)-4'-O-tetrahydropyranyl-adriamycin (THP) and its combination with other antitumor agents on murine tumors. *J. Antibiot. (Tokyo)* **38**, 1408-19.
- Mayer, R.D., Wang, X., and Maines, M.D. (2003) Nitric oxide inhibitor N omega-nitro-l-arginine methyl ester potentiates induction of heme oxygenase-1 in kidney ischemia/reperfusion model: a novel mechanism for regulation of the oxygenase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **306**, 43-50.
- McCoubrey, W.K., Jr., Huang, T.J., and Maines, M.D. (1997) Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur. J. Biochem.* **247**, 725-32.
- Milner, J.A. (2001) Mechanisms by which garlic and allyl sulfur compounds suppress carcinogen bioactivation. Garlic and carcinogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **492**, 69-81.
- Miralem, T., Hu, Z., Torno, M.D., Lelli, K.M., and Maines, M.D. (2005) Small interference RNA-mediated gene silencing of human biliverdin reductase, but not that of heme oxygenase-1, attenuates arsenite-mediated induction of the oxygenase and increases apoptosis in 293A kidney cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 17084-92.
- Morimoto, K., Ohta, K., Yachie, A., Yang, Y., Shimizu, M., Goto, C., Toma, T., Kasahara, Y., Yokoyama, H., Miyata, T., Seki, H. and Koizumi, S. (2001) Cytoprotective role of heme oxygenase (HO)-1 in human kidney with various renal diseases. *Kidney Int.* **60**, 1858-66.
- Morse, D. and Choi, A.M. (2002) Heme oxygenase-1: the "emerging molecule" has arrived. *Am J Respir Cell Mol Biol* **27**, 8-16.
- Motterlini, R., Foresti, R., Bassi, R., Calabrese, V., Clark, J.E., and Green, C.J. (2000) Endothelial heme oxygenase-1 induction by hypoxia. Modulation by inducible nitric-oxide synthase and S-nitrosothiols. *J. Biol. Chem.* **275**, 13613-20.
- Motterlini, R., Foresti, R., Bassi, R., and Green, C.J. (2000) Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 1303-12.
- Motterlini, R., Foresti, R., Intaglietta, M., and Winslow, R.M. (1996) NO-mediated activation of heme oxygenase: endogenous cytoprotection against oxidative stress to endothelium. *Am. J. Physiol.* **270**, H107-14.
- Munday, R. and Munday, C.M. (2004) Induction of phase II detoxification enzymes in rats by plant-derived isothiocyanates: comparison of allyl isothiocyanate with sulforaphane and related compounds. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 1867-71.
- Naito, Y., Takagi, T., and Yoshikawa, T. (2004) Heme oxygenase-1: a new therapeutic target for inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol. Ther.* **20 Suppl 1**, 177-84.
- Nakao, A., Otterbein, L.E., Overhaus, M., Sarady, J.K., Tsung, A., Kimizuka, K., Nalesnik, M.A., Kaizu, T., Uchiyama, T., Liu, F., Murase, N., Bauer, A.J., and Bach, F.H. (2004) Biliverdin protects the functional integrity of a transplanted syngeneic small bowel. *Gastroenterology* **127**, 595-606.
- Nakaso, K., Yano, H., Fukuhara, Y., Takeshima, T., Wada-Isoe, K. and Nakashima, K. (2003) PI3K is a key molecule in the Nrf2-mediated regulation of antioxidative proteins by hemin in human neuroblastoma cells. *FEBS Lett.* **546**, 181-4.
- Numazawa, S., Ishikawa, M., Yoshida, A., Tanaka, S., and Yoshida, T. (2003) Atypical protein kinase C mediates activation of NF-E2-related factor 2 in response to oxidative stress. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **285**, C334-42.
- Ogawa, K., Sun, J., Taketani, S., Nakajima, O., Nishitani, C., Sassa, S., Hayashi, N., Yamamoto, M., Shibahara, S., Fujita, H., and Igarashi, K. (2001) Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1. *Embo J.* **20**, 2835-43.
- Otterbein, L.E., Bach, F.H., Alam, J., Soares, M., Tao Lu, H., Wysk, M., Davis, R.J., Flavell, R.A., and Choi, A.M. (2000) Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat. Med.* **6**, 422-8.
- Otterbein, L.E., Soares, M.P., Yamashita, K., and Bach, F.H. (2003) Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol.* **24**, 449-55.
- Owuor, E.D. and Kong, A.N. (2002) Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem. Pharmacol.* **64**, 765-70.
- Peng, H.B., Rajavashisth, T.B., Libby, P., and Liao, J.K. (1995) Nitric oxide inhibits macrophage-colony stimulating factor gene transcription in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 17050-5.
- Perrella, M.A. and Yet, S.F. (2003) Role of heme oxygenase-1 in cardiovascular function. *Curr. Pharm. Des.* **9**, 2479-87.
- Polte, T., Abate, A., Dennery, P.A., and Schroder, H. (2000) Heme oxygenase-1 is a cGMP-inducible endothelial protein and mediates the cytoprotective action of nitric oxide. *Arterio-*

- scler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 1209-15.
- Polte, T., Oberle, S., and Schroder, H. (1997) The nitric oxide donor SIN-1 protects endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated cytotoxicity: possible role for cyclic GMP and heme oxygenase. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **29**, 3305-10.
- Polte, T. and Schroder, H. (1998) Cyclic AMP mediates endothelial protection by nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **251**, 460-5.
- Pomeraniec, Y., Grion, N., Gadda, L., Pannunzio, V., Podesta, E. J., and Cymeryng, C.B. (2004) Adrenocorticotropin induces heme oxygenase-1 expression in adrenal cells. *J. Endocrinol.* **180**, 113-24.
- Primiano, T., Kensler, T.W., Kuppusamy, P., Zweier, J.L., and Sutter, T.R. (1996) Induction of hepatic heme oxygenase-1 and ferritin in rats by cancer chemopreventive dithiolethiones. *Carcinogenesis* **17**, 2291-6.
- Quan, S., Yang, L., Shenouda, S., Jiang, H., Balazy, M., Schwartzman, M.L., Shibahara, I., Shinohara, K., and Abraham, N.G. (2002) Functional expression of human heme oxygenase-1 (HO-1) driven by HO-1 promoter in vitro and in vivo. *J. Cell. Biochem.* **85**, 410-21.
- Raju, V.S. and Maines, M.D. (1996) Renal ischemia/reperfusion up-regulates heme oxygenase-1 (HSP32) expression and increases cGMP in rat heart. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **277**, 1814-22.
- Ramos-Gomez, M., Kwak, M.K., Dolan, P.M., Itoh, K., Yamamoto, M., Talalay, P., and Kensler, T.W. (2001) Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 3410-5.
- Rensing, H., Bauer, I., Kubulus, D., Wolf, B., Winning, J., Ziegeler, S., and Bauer, M. (2004) Heme oxygenase-1 gene expression in pericentral hepatocytes through beta1-adrenoceptor stimulation. *Shock* **21**, 376-87.
- Rensing, H., Jaeschke, H., Bauer, I., Patau, C., Datene, V., Pannen, B.H., and Bauer, M. (2001) Differential activation pattern of redox-sensitive transcription factors and stress-inducible dilator systems heme oxygenase-1 and inducible nitric oxide synthase in hemorrhagic and endotoxic shock. *Crit. Care Med.* **29**, 1962-71.
- Roebuck, B.D., Curphey, T.J., Li, Y., Baumgartner, K.J., Bodredigari, S., Yan, J., Gange, S.J., Kensler, T.W., and Sutter, T.R. (2003) Evaluation of the cancer chemopreventive potency of dithiolethione analogs of olitipraz. *Carcinogenesis* **24**, 1919-28.
- Rushworth, S.A. and O'Connell, M.A. (2004) Haem oxygenase-1 in inflammation. *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 1093-4.
- Ryter, S.W. and Choi, A.M. (2005) Heme oxygenase-1: redox regulation of a stress protein in lung and cell culture models. *Antioxid. Redox Signal.* **7**, 80-91.
- Ryter, S.W., Morse, D., and Choi, A.M. (2004) Carbon monoxide: to boldly go where NO has gone before. *Sci. STKE* **2004**, RE6.
- Ryter, S.W., Otterbein, L.E., Morse, D., and Choi, A.M. (2002) Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Mol. Cell. Biochem.* **234**, 235, 249-63.
- Sahoo, S.K., Sawa, T., Fang, J., Tanaka, S., Miyamoto, Y., Akaike, T., and Maeda, H. (2002) Pegylated zinc protoporphyrin: a water-soluble heme oxygenase inhibitor with tumor-targeting capacity. *Bioconjug. Chem.* **13**, 1031-8.
- Salinas, M., Diaz, R., Abraham, N.G., Ruiz de Galarreta, C.M., and Cuadrado, A. (2003) Nerve growth factor protects against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by increasing expression of heme oxygenase-1 in a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **278**, 13898-904.
- Salinas, M., Wang, J., Rosa de Sagarra, M., Martin, D., Rojo, A. I., Martin-Perez, J., Ortiz de Montellano, P.R., and Cuadrado, A. (2004) Protein kinase Akt/PKB phosphorylates heme oxygenase-1 in vitro and in vivo. *FEBS Lett.* **578**, 90-4.
- Sato, K., Ito, K., Kohara, H., Yamaguchi, Y., Adachi, K., and Endo, H. (1992) Negative regulation of catalase gene expression in hepatoma cells. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 2525-33.
- Scapagnini, G., Foresti, R., Calabrese, V., Giuffrida Stella, A.M., Green, C.J., and Motterlini, R. (2002) Caffeic acid phenethyl ester and curcumin: a novel class of heme oxygenase-1 inducers. *Mol. Pharmacol.* **61**, 554-61.
- Schipper, H.M. (2000) Heme oxygenase-1: role in brain aging and neurodegeneration. *Exp. Gerontol.* **35**, 821-30.
- Shan, Y., Lambrecht, R.W., and Bonkovsky, H.L. (2004) Identification of key elements that are responsible for heme-mediated induction of the avian heme oxygenase-1 gene. *Biochim. Biophys. Acta* **1679**, 87-94.
- Sheen, L.Y., Chen, H.W., Kung, Y.L., Liu, C.T., and Lii, C.K. (1999) Effects of garlic oil and its organosulfur compounds on the activities of hepatic drug-metabolizing and antioxidant enzymes in rats fed high- and low-fat diets. *Nutr. Cancer* **35**, 160-6.
- Shibahara, S., Sato, M., Muller, R.M., and Yoshida, T. (1989) Structural organization of the human heme oxygenase gene and the function of its promoter. *Eur. J. Biochem.* **179**, 557-63.
- Simizu, S., Takada, M., Umezawa, K., and Imoto, M. (1998) Requirement of caspase-3(-like) protease-mediated hydrogen peroxide production for apoptosis induced by various anticancer drugs. *J. Biol. Chem.* **273**, 26900-7.
- Singh, A.V., Xiao, D., Lew, K.L., Dhir, R., and Singh, S.V. (2004) Sulforaphane induces caspase-mediated apoptosis in cultured PC-3 human prostate cancer cells and retards growth of PC-3 xenografts in vivo. *Carcinogenesis* **25**, 83-90.
- Singh, S.V., Herman-Antosiewicz, A., Singh, A.V., Lew, K.L., Srivastava, S.K., Kamath, R., Brown, K.D., Zhang, L., and Baskaran, R. (2004) Sulforaphane-induced G2/M phase cell cycle arrest involves checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of cell division cycle 25C. *J. Biol. Chem.* **279**, 25813-22.
- Srisook, K., Jung, N.H., Kim, B.R., Cha, S.H., Kim, H.S., and Cha, Y.N. (2005) Heme oxygenase-1-mediated partial cytoprotective effect by NO on cadmium-induced cytotoxicity in C6 rat glioma cells. *Toxicol. In Vitro* **19**, 31-9.
- Surh, Y.J. (2003) Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 768-80.
- Suzuki, H., Tashiro, S., Sun, J., Doi, H., Satomi, S., and Igarashi,

- K. (2003) Cadmium induces nuclear export of Bach1, a transcriptional repressor of heme oxygenase-1 gene. *J. Biol. Chem.* **278**, 49246-53.
- Takahashi, M., Dore, S., Ferris, C.D., Tomita, T., Sawa, A., Wolosker, H., Borchelt, D.R., Iwatsubo, T., Kim, S.H., Thianakaran, G., Sisodia, S.S., and Snyder, S.H. (2000) Amyloid precursor proteins inhibit heme oxygenase activity and augment neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Neuron* **28**, 461-73.
- Takahashi, T., Morita, K., Akagi, R., and Sassa, S. (2004) Heme oxygenase-1: a novel therapeutic target in oxidative tissue injuries. *Curr. Med. Chem.* **11**, 1545-61.
- Takeda, K., Ishizawa, S., Sato, M., Yoshida, T., and Shibahara, S. (1994) Identification of a cis-acting element that is responsible for cadmium-mediated induction of the human heme oxygenase gene. *J. Biol. Chem.* **269**, 22858-67.
- Takeda, K., Lin, J., Okubo, S., Akazawa-Kudoh, S., Kajinami, K., Kanemitsu, S., Tsugawa, H., Kanda, T., Matsui, S., and Takekoshi, N. (2004) Transient glucose deprivation causes upregulation of heme oxygenase-1 and cyclooxygenase-2 expression in cardiac fibroblasts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **36**, 821-30.
- Tamion, F., Richard, V., Bonmarchand, G., Leroy, J., Lebreton, J. P., and Thuillez, C. (2001) Induction of heme-oxygenase-1 prevents the systemic responses to hemorrhagic shock. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164**, 1933-8.
- Tenhunen, R., Marver, H.S., and Schmid, R. (1968) The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **61**, 748-55.
- Terry, C.M., Clikeman, J.A., Hoidal, J.R., and Callahan, K.S. (1999) TNF-alpha and IL-1alpha induce heme oxygenase-1 via protein kinase C, Ca²⁺, and phospholipase A2 in endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **276**, H1493-501.
- Tetsuka, T., Daphna-Iken, D., Srivastava, S.K., and Morrison, A. R. (1995) Regulation of heme oxygenase mRNA in mesangial cells: prostaglandin E2 negatively modulates interleukin-1-induced heme oxygenase-1 mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **212**, 617-23.
- Tongers, J., Fiedler, B., Konig, D., Kempf, T., Klein, G., Heineke, J., Kraft, T., Gambaryan, S., Lohmann, S.M., Drexler, H., and Wollert, K.C. (2004) Heme oxygenase-1 inhibition of MAP kinases, calcineurin/NFAT signaling, and hypertrophy in cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res.* **63**, 545-52.
- Uehara, K., Takahashi, T., Fujii, H., Shimizu, H., Omori, E., Matsumi, M., Yokoyama, M., Morita, K., Akagi, R., and Sassa, S. (2005) The lower intestinal tract-specific induction of heme oxygenase-1 by glutamine protects against endotoxemic intestinal injury. *Crit. Care Med.* **33**, 381-90.
- Vicente, A.M., Guillen, M.I., and Alcaraz, M.J. (2003) Heme oxygenase-1 induction and regulation in unstimulated mouse peritoneal macrophages. *Biochem. Pharmacol.* **65**, 905-9.
- Vicente, A.M., Guillen, M.I., Habib, A., and Alcaraz, M.J. (2003) Beneficial effects of heme oxygenase-1 up-regulation in the development of experimental inflammation induced by zymo-
- san. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **307**, 1030-7.
- Vicente, A.M., Guillen, M.I., and Alcaraz, M.J. (2003) Participation of heme oxygenase-1 in a model of acute inflammation. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **228**, 514-6.
- Wakabayashi, N., Itoh, K., Wakabayashi, J., Motohashi, H., Noda, S., Takahashi, S., Imakado, S., Kotsuji, T., Otsuka, F., Roop, D.R., Harada, T., Engel, J.D., and Yamamoto, M. (2003) Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation. *Nat. Genet.* **35**, 238-45.
- Wang, X.H., Wang, K., Zhang, F., Li, X.C., Li, J., De, W., Guo, J., Qian, X.F., and Fan, Y. (2005) Heme oxygenase-1 alleviates ischemia/reperfusion injury in aged liver. *World J. Gastroenterol.* **11**, 690-4.
- Wang, X.H., Wang, K., Zhang, F., Li, X.C., Qian, X.F., Cheng, F., Li, G.Q., and Fan, Y. (2004) Alleviating ischemia-reperfusion injury in aged rat liver by induction of heme oxygenase-1. *Transplant. Proc.* **36**, 2917-23.
- Wijayanti, N., Huber, S., Samoylenko, A., Kietzmann, T., and Immenschuh, S. (2004) Role of NF-kappaB and p38 MAP kinase signaling pathways in the lipopolysaccharide-dependent activation of heme oxygenase-1 gene expression. *Antioxid. Redox Signal.* **6**, 802-10.
- Willis, D. (1995) Expression and modulatory effects of heme oxygenase in acute inflammation in the rat. *Inflamm. Res.* **44 Suppl 2**, S218-20.
- Willis, D., Moore, A.R., Frederick, R., and Willoughby, D.A. (1996) Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat. Med.* **2**, 87-90.
- Yamanaka, N. and Deamer, D. (1974) Superoxide dismutase activity in WI-38 cell cultures: effects of age, trypsinization and SV-40 transformation. *Physiol. Chem. Phys.* **6**, 95-106.
- Yang, C.S., Chhabra, S.K., Hong, J.Y., and Smith, T.J. (2001) Mechanisms of inhibition of chemical toxicity and carcinogenesis by diallyl sulfide (DAS) and related compounds from garlic. *J. Nutr.* **131**, 1041S-5S.
- Yet, S.F., Layne, M.D., Liu, X., Chen, Y.H., Ith, B., Sibinga, N. E., and Perrella, M.A. (2003) Absence of heme oxygenase-1 exacerbates atherosclerotic lesion formation and vascular remodeling. *Faseb J.* **17**, 1759-61.
- Zhang, D.D. and Hannink, M. (2003) Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 8137-51.
- Zhang, M., Zhang, B.H., Chen, L., and An, W. (2002) Overexpression of heme oxygenase-1 protects smooth muscle cells against oxidative injury and inhibits cell proliferation. *Cell Res.* **12**, 123-32.
- Zhang, X., Bedard, E.L., Potter, R., Zhong, R., Alam, J., Choi, A.M., and Lee, P.J. (2002) Mitogen-activated protein kinases regulate HO-1 gene transcription after ischemia-reperfusion lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **283**, L815-29.