



저산소유도인자 HIF-1, 암 억제인자 P53과 고아 핵수용체 Nur77의 발현을 지표로 하는 발암독성예측 세포주의 개발

홍일^{1,2} · 서희원^{1,2} · 이민호^{1,2} · 김지원^{1,2} · 정진호¹ · 이병훈¹ · 이미옥^{1,2}

서울대학교 ¹약학대학, ²생명공학공동연구원

Establishment of Reporter Cell Lines that Monitor Activities of Hypoxia Inducible Factor-1, P53 and Nur77 for Assessment of Carcinogenicity

Il Hong^{1,2}, Hee-won Seo^{1,2}, Min-Ho Lee^{1,2}, Ji-Won Kim^{1,2}, Jin-Ho Chung¹,
Byung Hoon Lee¹ and Mi-Ock Lee^{1,2}

¹College of Pharmacy, and ²Bio-MAX Institute, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Received July 10, 2007; Accepted August 29, 2007

Evaluation of potentials of chemicals to alter expression of genes that are involved in carcinogenesis may serve useful tools in toxicological research. In this investigation, we developed reporter cell lines that expressed luciferase in response to transactivation of hypoxia inducible factor-1, P53 tumor suppressor and Nur77 of which roles have been well established in cancer development and progression. Whereas these reporter cell lines displayed low constitutive backgrounds, the reporter activities were significantly enhanced in response to desferrioxamine/CoCl₂, adriamycin or 6-mercaptopurine, which are hypoxia mimicking chemicals, P53 activator or Nur77 inducer, respectively. The activation of the reporter was time- and dose-dependent. Known tumor initiators and promoters, such as phorbol 12-myristate 13-acetate and phorbol 12,13-dicaprylate induced the reporter activity at as low as 10 nM in these stable cell lines. Further, known anti-tumor promoters, such as ascorbic acid and β-carotene repressed the reporter activities. These results indicate that our stable reporter cell lines could serve as a useful system for rapid assessment of carcinogenicity of toxic chemicals.

Key words: Reporter cell line, HIF-1, P53, Nur77, Carcinogenicity.

서 론

화학 물질에 의한 암 발생은 크게 initiation과 promotion의 두 단계로 나뉜다(Nakadate, 1989; Trosko, 2001). Initiation 단계에서 initiator는 DNA와 결합하거나 발암 물질-DNA 부가물을 형성하여 genome 상의 변화를 유발하며, 화학물질의 initiation 여부를 확인하기 위해서는 Ames salmonella/microsome assay, chromosome aberration assay 등의 다양한 *in vitro* 및 *in vivo* 검색

법이 사용되어 왔다(Cohen, 2001; Tennant *et al.*, 1987). Promotion 단계에서 promoter는 반복된 노출을 통해 initiation이 일어난 세포의 분열과 증식을 야기하며, 이때 관여하는 분자생물학적 기작으로는 protein kinase C의 활성화, 세포내 칼슘의 증가, free radical 생성 등이 알려져 있다(Klaunig *et al.*, 1998; Nishizuka, 1984). 그 동안 tumor promotion에 관여하는 화학 물질을 검색하기 위해 *in vivo* two-stage carcinogenesis model이 활발히 사용되어 왔지만, 비용이 많이 들고 시간이 오래 걸리기 때문에 이에 대한 대안으로서 효율적인 *in vitro* 검색계를 개발하고자 하는 많은 연구가 수행되고 있다. 현재 *in vivo*에서 일어나는 암 발생 과정을 세포 수준에서 측정하고자 하는 다양한 방법들이 고안되었으며, 그 예로는

Correspondence to: Mi-Ock Lee, College of Pharmacy and Bio-MAX Institute, Seoul National University, San 56-1 Sillim-dong, Gwanak-gu, Seoul 151-742, Korea
E-mail: molee@snu.ac.kr

ornithine decarboxylase induction(Auvinen *et al.*, 1992), gap junctional intercellular communication (Yamasaki, 1990), *in vitro* cell transformation(Barrett *et al.*, 1984) 방법을 들 수 있다. 그러나 현재 가장 널리 사용되고 있는 *in vitro* transformation assay의 경우, transformation foci를 확인하기까지 4주에서 6주 정도의 긴 세포 배양시간이 소요된다는 점과 transformation의 낮은 빈도, 고비용, 그리고 많은 노력이 투자되어야 하는 단점이 있다(Fang *et al.*, 2001).

국내에서 화학물질에 의한 발암성 검색을 위하여 *in vivo* two stage carcinogenesis model을 사용한 연구는 거의 이루어진 바가 없으며, *in vitro* 대체 시험계의 개발도 최근에만 시도되고 있다. 다만 천연물 또는 영양소의 항암 작용을 규명하기 위하여 *in vivo* two-stage carcinogenesis animal model을 사용하여 연구된 예는 있으나 대부분 실험동물의 발암기간을 단축시키기 위하여 phorbol 12-myristate 13-acetate(TPA) 같은 tumor promoter를 사용하고 있다. 따라서 암 발생 과정에서 일어나는 중요한 분자생물학적 변화를 예측 지표로 하여 발암성을 검색할 수 있는 *in vitro* 검색계를 개발한다면 기존의 *in vivo* 및 *in vitro* 검색계를 대체 또는 보조할 수 있으며, 저비용과 고효율을 만족시킬 수 있는 새로운 평가법을 확립할 수 있을 것이다.

저산소 유도인자(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)는 저산소 상태에서 발현이 증가되며 세포내 산소 항상성을 유지하기 위해서 erythropoiesis, 신혈관생성 그리고 glycolytic metabolism에 관련된 유전자를 발현시키는 기능을 하는 전사인자이다. 특히 HIF-1은 각종 고형암에서 암 성장 촉진 유전자들의 조절인자 역할을 하여 신혈관형성 및 전이를 촉진시키기 때문에 HIF-1의 활성화는 발암과 진행의 좋은 척도라고 할 수 있다(Bae *et al.*, 2004; Baek *et al.*, 2005; Berra *et al.*, 2003; Chan *et al.*, 2002; Cioffi *et al.*, 2003; Erez *et al.*, 2003). P53은 잘 알려진 암 억제 유전자로서 그 단백질 산물은 DNA가 손상되었을 때 세포주기를 정지시키고, 복구 불가능한 손상일 경우 세포의 사멸(apoptosis)를 유발한다고 알려져 있다. 인체 종양의 약 50%에서 P53의 기능이 결손되어 있다는 사실로부터 발암과정에서 P53 유전자의 중요성을 알 수 있다(Fraser *et al.*, 2006). Nur77(NGFI-B 또는 TR3)는 steroid/ thyroid/retinoid receptor superfamily에 속하며 현재까지 리간드가 밝혀지지 않은 고아 핵 수용체(orphan nuclear receptor)로서, 하루 목적 유전자의 발현을 증가 또는 감소시키는 전사인자이다. Nur77은 세포 증식과 사멸이라는 중요한 두 가지 상반된 세포내 기능을 수행함으로써 세포의 운명을 결정짓는 결정자(decision

maker)로서 역할을 하는 것으로 알려져 있다. Nur77은 각종 mitogen과 성장인자에 의해 발현이 유도된다고 보고되고 있으며 암세포에서는 성장인자 매개 신호전달의 과잉으로 과발현되어 있는 경우가 많다. 이러한 사실은 Nur77가 암세포의 증식을 매개하는 주요 인자임을 시사한다(Choi *et al.*, 2004; Dequiedt *et al.*, 2005). 따라서 신규 화학물질에 의한 이들 관련 단백질의 활성여부는 이 화학물질의 발암성을 예측하는 훌륭한 예측지표로 사용될 수 있을 것이다.

본 연구에서는 발암의 분자세포생물학적 기전에 근거하여 신혈관 생성과 암전이, DNA 손상, 세포 사멸과 증식을 모니터 할 수 있는 HIF-1, P53과 Nur77의 발현을 지표로 하여 이를 측정할 수 있는 리포터 유전자 영구 발현 세포주를 확립하였다. 또한 이러한 리포터 세포주의 신규 화학물질의 발암 검색 대체 시험계로서의 활용 가능성을 타진하였다.

재료 및 방법

세포주 및 세포배양. 인체 간암 세포주 HepG2(ATCC CCL 221)와 폐암 세포주 A549(ATCC CCL-185)는 10% fetal bovine serum, penicillin(100 U/ml)과 streptomycin(100 µg/ml)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium을 사용하여 5% CO₂에서 배양하여 실험에 사용하였다. pcDNA3.1/neo는 Invitrogen(San Diego, CA)에서, Superfect Transfection reagent는 Qiagen (Valencia, CA)에서 구입하였다. Luciferase assay kit와 pGL2 vector는 Promega(Madison, WI)에서 구입하였다.

Reporter plasmids 및 영구 발현 세포주 확립. 실험에 사용한 p53-response element(RE), Nur77 promoter (-580~+51)와 hypoxia response element(HRE)를 코딩하는 reporter construct는 이전 논문을 통하여 보고된 바 있다(Fig. 1)(Ema *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 2000). 1×10⁵ 세포를 60 mm² 배양접시에 접종하여 하룻 밤 배양한 후, pcDNA3.1/neo 1 µg과 리포터 plasmid 1 µg을 LipofectaminPlus Transfection reagent(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 유전자 이입하였다. 48시간 후 geneticin(300~800 µg/ml)이 포함된 배양액을 넣어 주고 2~3일 간격으로 세포배양액을 갈아 주었다. 4~6주 후 살아 남은 콜로니를 얻어 geneticin 존재 하에 배양하여 세포수를 증폭시켰다. 얻어진 각 콜로니에 desferrioxamine(DFO), adriamycin, 6-mercaptopurin(6-MP) 등 각각 HIF-1, P53과 Nur77 활성물질을 처리하여 luciferase 활성을 측정하고 가장 높은 반

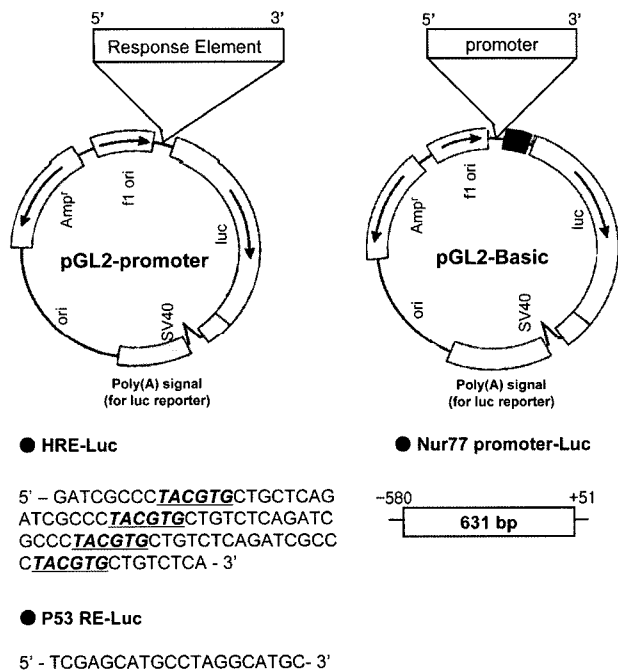


Fig. 1. Schematic presentation of HRE-Luc, P53RE-Luc, and Nur77 promoter-Luc reporter plasmids.

용성을 보이는 콜로니를 선택하여 세포주로 확립하였다.

Reporter gene assay. 1×10^5 세포를 12 well culture plate에 접종한 후 하루 동안 배양하고, 지표 유전자의 발현을 유도하는 다양한 화학 물질을 16~20시간 처리하였다. 배양이 끝난 후, 0.25 mM Tris-HCl(pH 8.0)을 가한 뒤 3 차례의 freezing-thawing cycle에 의해 cell lysate를 제조하고 luciferase assay(Promega, Madison, WI)와 단백질 정량을 위한 bicinchoninic acid 분석(Pierce, Madison, WI)을 시행하였다. Luciferase 활성은 3회 이상 실험한 후, 값을 mean \pm S.E.M로 표시하였다. 각 군 간의 차이는 one-way ANOVA test를 실시한 후, Duncan's multiple range test를 실시하여 유의성 정도를 판정하였다. 유의적인 차이는 p value가 < 0.05 이하인 경우에 인정하였다.

RT-PCR(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction). 2×10^5 세포를 60 mm² 접종한 후 하루 동안 배양하고 100 μ M DFO 또는 0.1 μ g/ml adriamycin을 시간, 또는 농도 별로 처리하였다. Total RNA 3 μ g와 4 μ g random hexamer를 65°C에서 5분간 annealing 시킨 후 M-MLV reverse transcriptase 5 units(Gibco-BRL, Grand Island, NY)를 이용하여 single-stranded DNA를 합성하였다. PCR 반응에는 forward와 reverse

primer(각 10 pmol)와 taq DNA polymerase(1 unit)(Genemed Inc, Korea)를 사용하였다. PCR 증폭은 MJ Research PTC 200 thermal cycler(Reno, NV)를 사용하였으며 사용한 primer의 염기서열은 다음과 같다. Luciferase: forward, 5'-TCG AAA TGT CCG TTC GGT-3'; reverse, 5'-TGG CAT GCG AGA ATC TGA-3', β -actin: forward, 5'-CGT GGG CCG CCC TAG GCA

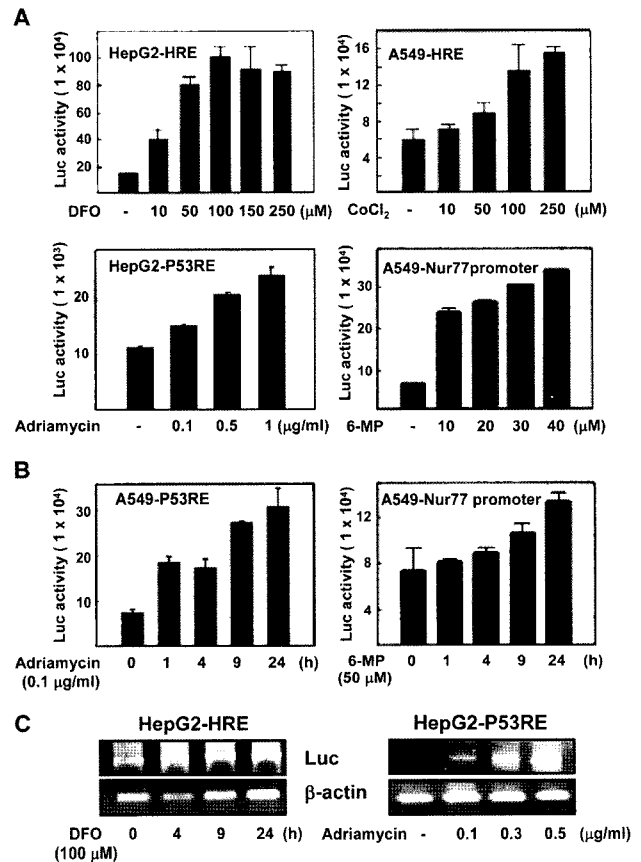


Fig. 2. Dose- and time-dependent activation of luciferase by DFO, adriamycin and 6-MP in the reporter cell lines. (A) HepG2-HRE and A549-HRE stable cells were treated with the indicated concentrations of DFO or CoCl₂ for 24 h. At the end of treatment, cell lysates were obtained and analyzed for luciferase activity. Data shown are the mean \pm S.D. of three independent experiments. (B) A549-P53RE or A549-Nur77 promoter stable cells were treated with 0.1 μ g/ml adriamycin or 50 μ M 6-MP, respectively, for the indicated time period. At the end of treatment, cell lysates were obtained and analyzed for luciferase activity. Data shown are the mean \pm S.D. of three independent experiments. (C) HepG2-HRE or HepG2-P53RE stable cells were treated with 100 μ M DFO for the indicated time periods or with the indicated concentrations of adriamycin for 24 h. At the end of treatment, the expression of luciferase transcripts was analyzed by RT-PCR. Results shown are representatives of at least three independent experiments.

CCA-3'; reverse, 5'-TTG GCT TAG GGT TCA GGG GGG-3'.

결과 및 고찰

발암성 모니터링 유전자 영구 발현 세포주의 확립. 인체 간암 세포주 HepG2 와 폐암 세포주 A549에 HRE, p53RE, Nur77 promoter(-454~57)와 luciferase(luc)를 코딩하는 reporter plasmid(Ema *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 2000)와 neomycin resistant gene인 pcDNA3.1/neo를 co-transfection 시킨 후, 600~800 mg/ml G418을 포함하는 배양액에서 4~6주간 동안 배양하여 영구발현 세포주를 클로닝하였다(Fig. 1). HepG2 세포주에서 HRE-luc, P53RE-luc를 발현하는 클론을 각각 4개와 1개를 얻었으며, A549 세포주에서는 HRE-luc, P53RE-luc, Nur77 promoter(-454~57)-luc를 발현하는 클론을 각각 8개, 7개, 8개를 얻을 수 있었다. 대표적 클론에 대해 각각의 작용기전 특이 화합물에 대한 luciferase 활성을 분석하여 각 클론의 반응성을 확인하였다. Fig. 2A에서 보는 바와 같이 각 클론은 시간과 농도에 의존적인 활성 경향을 나타내었다. HRE 세포주의 경우, DFO는 HepG2-HRE 세포주에서 100 mM에서 최고 반응성을 보였으며 CoCl₂는 A549-HRE 세포주에서 250 μM 까지 지속적인 증가를 보였다. HepG2-P53RE는 adriamycin 1 μg/ml에서 최고 반응성을 보였으며 Nur77 promoter 세포주에서도 역시 6-MP에 의해 농도-의존적인 활성 증가가 관찰되었다. Fig. 2B에서 보는 바와 같이 A549-p53RE는 0.1 μg/ml adriamycin로 처리한 경우 24 시간 까지 활성이 지속적으로 증가하였으며, A549-Nur77

promoter 세포주에서도 6-MP에 의해 시간에 따라 활성이 증가되었다.

관찰된 luciferase의 활성 증가가 luciferase의 전사수준에서의 발현 증가에서 기인됨을 증명하기 위해 RT-PCR을 수행하였다. DFO와 adriamycin을 처리하였을 때, luciferase의 전사체 발현이 농도-의존적으로 증가함을 확인하였다(Fig. 2C). 또한 얻어진 영구 발현 세포주와 parent 세포주를 비교하였을 때 세포의 증식 속도에는 변화가 없음을 확인하였다(data now shown).

Tumor initiator와 promoter를 이용한 발암성 예측 세포주의 검증. 확립된 세포주의 발암성 예측 세포주로서의 가능성을 타진하기 위하여 기존에 발암성이 알려진 대표적인 tumor initiator와 promoter를 활용하였다. 각 화합물의 알려진 발암 기작은 Table 1에서 보는 바와 같다. 각 리포터 세포주의 활성을 측정하였을 때, HRE발현 세포주의 경우 HepG2에서는 TPA, okadaic acid 등에 의해 활성이 크게 측정되었고 A549에서는 thioacetamide, saccharin 등에 의해 활성을 나타내었다(Fig. 3). p53RE를 발현하는 HepG2와 A549 세포주에서는 공통적으로 alkylating agent인 methionine methylsulfonium chloride(MMS)에 의해 활성이 증가하였고, HepG2에서는 mitomycin C(MMC)에 의해서도 활성이 관찰되었다. Nur77 promoter를 발현하는 A549세포주에서는 MMC, MMS에 의해 활성이 증가되었으며, 이로서 alkylating agent에 의한 DNA damage 역시 Nur77을 활성화시킬 수 있었다. 흥미롭게도 HRE의 경우 세포주에 따라 반응이 다르게 나타났다. 즉 TPA는 HepG2에서 HRE를 강하게 활성화시켰지만 A549에서는 활성변화가 미미하였

Table 1. Chemicals used in this study

	Class	Chemical	Reference	
Tumor initiators and promoters	Phosphatase inhibitors	Okadaic acid	Chan <i>et al.</i> , 2004; Schmidt <i>et al.</i> , 1995	
	Calcium elevators	Thapsigargin	Korge <i>et al.</i> , 1999	
	Phthalate ester	WY-14643, Dibutyl phthalate (DBP) Dioctyl phthalate (DEHP)	Seth, 1982; Henley <i>et al.</i> , 2006	
	Protein kinase activator	Phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA), Phorbol 12,13-dicaprinate (PDD), Phorbol 12,13-diacetate (PDA), 4α-TPA, Phorbol	Chan <i>et al.</i> , 2004; Verma <i>et al.</i> , 1998	
	Free radical generators	Dithranol, Benzoyl peroxide	Farkas <i>et al.</i> , 2001; Burke <i>et al.</i> , 1983	
	Alkylating agents	Mitomycin C (MMC) Methyl methanesulfonate (MMS)	Bradner, 2001; Begley <i>et al.</i> , 2004	
	Other promoters	Saccharin, Griseofulvin, Thioacetamide, Methothrexate	Arni, 1989; Arnold <i>et al.</i> , 1989; Knasmuller <i>et al.</i> , 1998; Genestier <i>et al.</i> , 2000	
	Anti-promoters	Anti-oxidants	β-Carotene, L-Ascorbic acid (ACA), L-Ascorbic acid 6-palmitate (ACAP)	Seifried <i>et al.</i> , 2003; Wang <i>et al.</i> , 1999; Kendig <i>et al.</i> , 2007
		Glucocorticoids	Dexamethasone (DEX)	Ahlström <i>et al.</i> , 2005

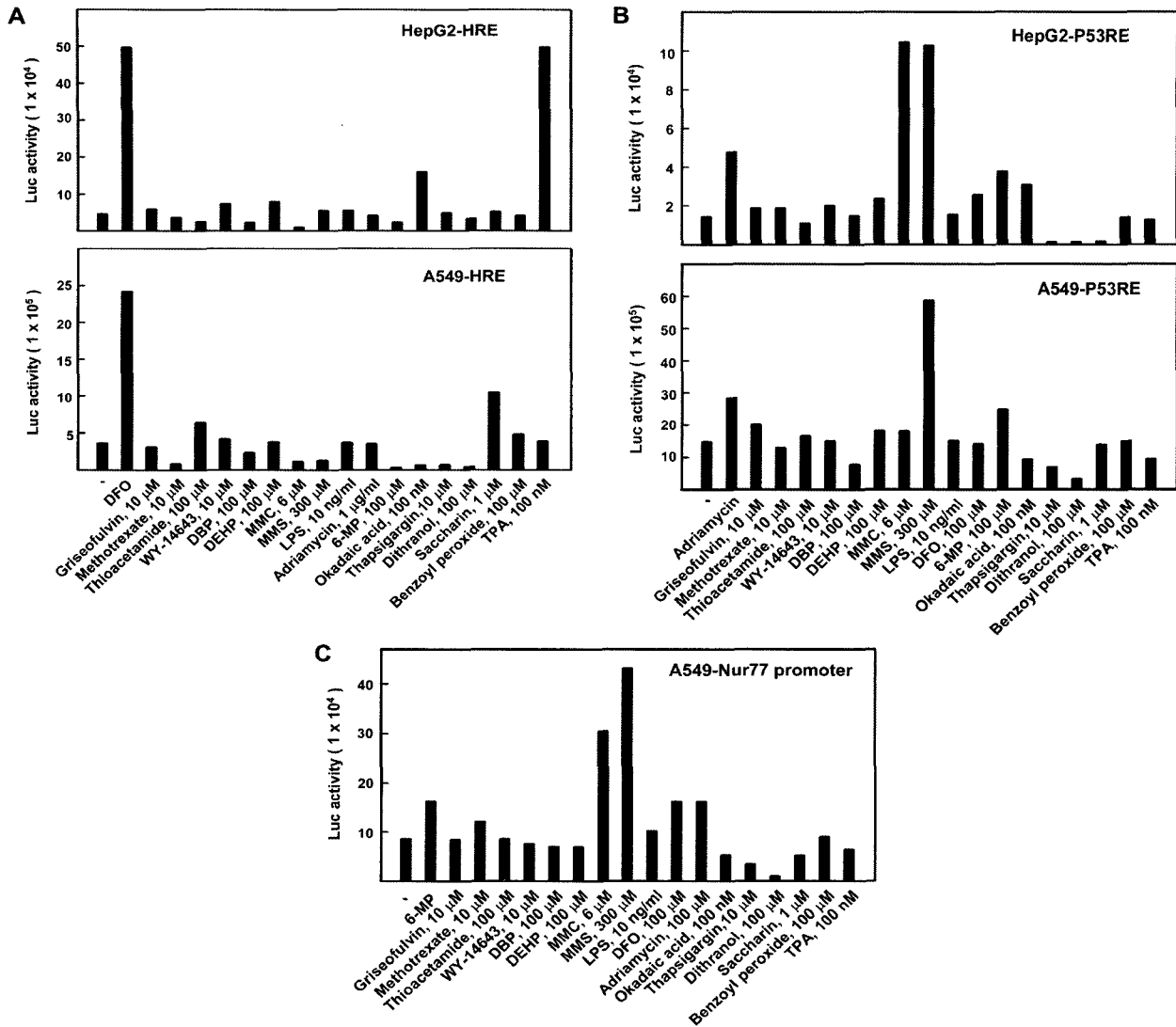


Fig. 3. Transcriptional activities of HRE, P53RE, and Nur77 promoter are induced by known tumor initiators and promoters in the reporter cell lines. (A) HepG2-HRE and A549-HRE, (B) HepG2-P53RE and A549-P53RE, and (C) A549-Nur77 promoter stable cells were treated with known tumor initiators and promoters (Table 1) for 24 h. 100 μ M DFO, 0.1 μ g/ml adriamycin, and 100 μ M 6-MP were treated as positive control. At the end of treatment, cell lysates were obtained and analyzed for luciferase activity.

다. 또한 TPA 유도체, 즉, phorbol, phorbol 12,13-diacetate(PDA), Phorbol 12,13-dicaprylate(PDD), TPA와 4 α -TPA(Fig. 4A)를 처리하여 luciferase 활성을 분석한 결과, HRE 발현 HepG2 세포주에서는 TPA가 용량 의존적으로 높은 활성을 나타내었으며 PDD 역시 활성이 높음을 알 수 있었다(Fig. 4B). 그러나 A549-HRE 세포주에서는 TPA 유도체가 유의적인 활성을 나타내지 않았다. 따라서 HIF-1의 활성은 세포내 환경에 따라 크게 차이가 나는 것으로 보인다. 이상의 결과는 첫째, 발암 물질과 발암예측 지표의 상관성을 보여주고 있으며 각 지표 세포주에 따라 활성화 시키는 발암물질이 다를 수 있다. 따라서 몇

가지 지표가 조합된 세포주 또한 광역한 발암물질을 모니터링하는데 유효하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 둘째, 기원이 다른 세포주에서는 리포터 활성에 차이가 있음을 보여주고 있다. 이로서 장기특이적인 발암과정 존재함을 알 수 있으며 다양한 기원의 발암 모니터링 세포주를 사용한다면 장기특이적 발암독성을 예측이 가능할 것으로 사료된다.

Anti-promoter에 의한 지표 인자 활성의 억제. Tumor promotion을 억제하는 anti-promoter로 알려진 ascorbate(ACA), ascorbyl palmitate(ACAP), dexametha-

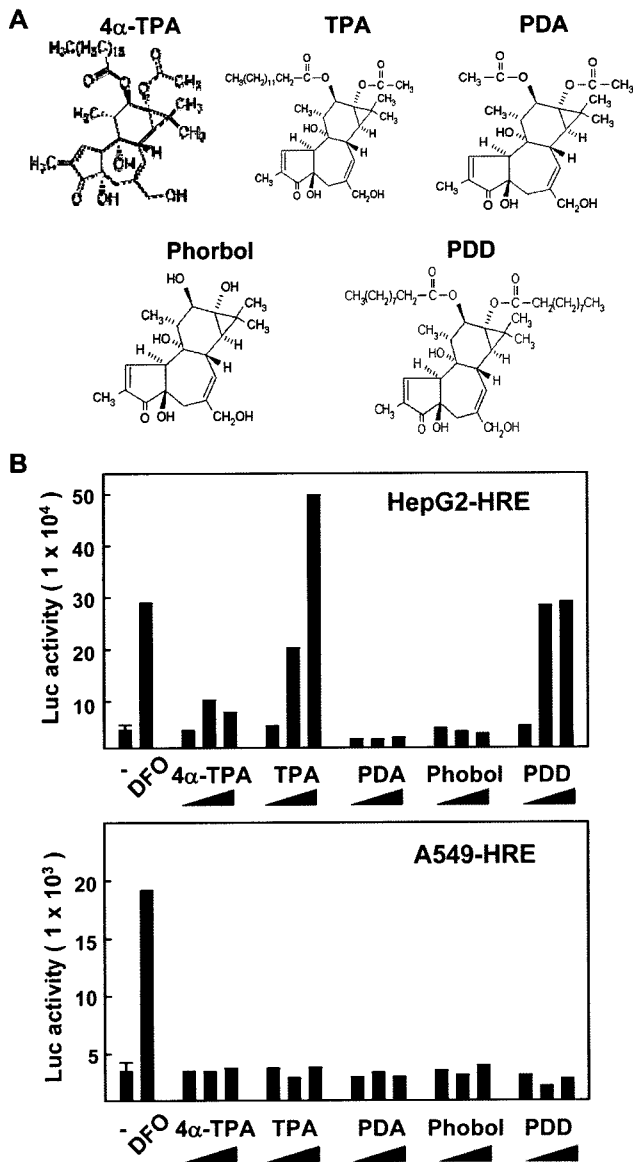


Fig. 4. Structure-activity relationship for TPA derivatives. (A) Chemical structure of TPA derivatives. (B) HepG2-HRE and A549-HRE cells were treated with the increasing concentrations (1 nM, 10 nM, and 100 nM) of TPA derivatives for 24 h. 100 μM DFO was treated as positive control. At the end of treatment, cell lysates were obtained and analyzed for luciferase activity.

son(DEX), β-carotene이 HRE-luc 리포터 활성을 억제할 수 있는 지 여부를 실험하였다(Table 1). HRE의 경우 A549 세포주에서 β-carotene와 ACA의 억제 효과가 탁월하였다. p53RE의 경우 HepG2와 A549 모두에서 DEX의 억제효과가 우수하였으며 ACA는 A549에서 좋은 억제효과를 나타내었다(Fig. 5). 이상의 연구결과로부터 본 연구에서 확립한 리포터 세포주를 통해 anti-promoter의 활성도 잘 반영할 수 있음을 확인하였다. 따라서 본 연구에

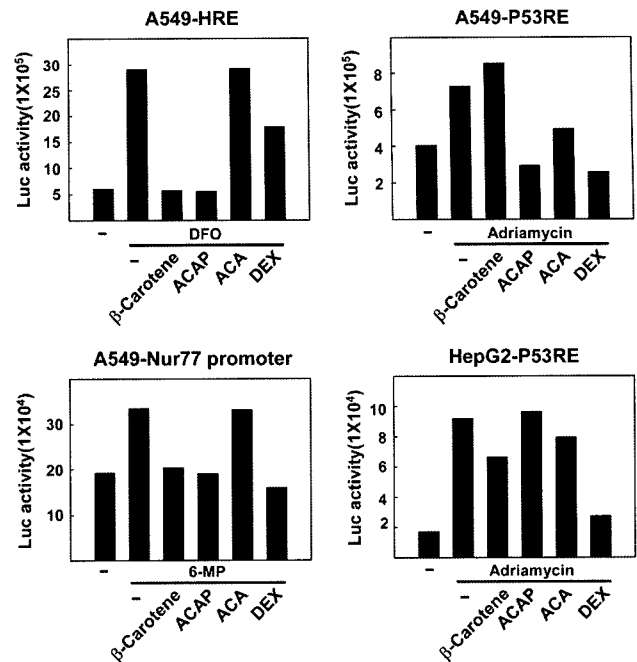


Fig. 5. Known anti-promoters inhibit the HRE, P53RE and Nur77 promoter activities in the stable cell lines. A549-HRE, A549-P53RE, HepG2-P53RE, and A549-Nur77 promoter stable cells were treated with 100 μM β-carotene, 100 μM L-ascorbic acid (ACA), 100 μM L-ascorbic acid, 6-palmitate (ACAP), and 10 μM dexamethasone (DEX) for 24 h. At the end of treatment, cell lysates were obtained and analyzed for luciferase activity.

서 확립한 세포주는 발암성을 검색할 수 있을 뿐만 아니라 anti-promoter를 연구하는데도 유용하게 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

본 과제에서 확립한 발암성 예측 세포주에 민감도와 간편성이 증진된다면 신규 및 기존 화학물질의 발암성을 검색하고 발암물질을 평가하는데 유용하게 사용될 수 있을 것이며 현재의 선진 기술을 능가할 수 있는 차세대 발암성 *in vitro* 독성 평가에 광범위하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2003-2005년도 식품의약품안전청 용역연구 개발사업의 연구비 지원(S-06-03-2-NVA-420-0-C)에 의해 수행 되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

Ahlström, M., Pekkinen, M., Huttunen, M. and Lamberg-Allardt, C. (2005). Dexamethasone down-regulates cAMP-phosphodiesterase in human osteosarcoma cells. *Bio-*

- chem. Pharmacol.*, **69**, 267-275.
- Ami, P. (1989). Review on the genotoxic activity of thioacetamide. *Mutat. Res.*, **221**, 153-162.
- Arnold, D.L. and Boyes, B.G. (1989). The toxicological effects of saccharin in short-term genotoxicity assays. *Mutat. Res.*, **221**, 69-132.
- Auvinen, M., Paasinen, A., Andersson, L.C. and Holttä, E. (1992). Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation. *Nature*, **360**, 355-358.
- Bae, S.H., Jeong, J.W., Park, J.A., Kim, S.H., Bae, M.K., Choi, S.J. and Kim, K.W. (2004). Sumoylation increases HIF-1 α stability and its transcriptional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **324**, 394-400.
- Baek, J.H., Mahon, P.C., Oh, J., Kelly, B., Krishnamachary, B., Pearson, M., Chan, D.A., Giaccia, A.J. and Semenza, G.L. (2005). OS-9 interacts with hypoxia-inducible factor 1 α and prolyl hydroxylases to promote oxygen-dependent degradation of HIF-1 α . *Mol. Cell.*, **17**, 503-512.
- Barrett, J.C., Hesterberg, T.W. and Thomassen, D.G. (1984). Use of cell transformation systems for carcinogenicity testing and mechanistic studies of carcinogenesis. *Pharmacol. Rev.*, **36**, 53-70.
- Begley, T.J. and Samson, L.D. (2004). Network responses to DNA damaging agents. *DNA Repair*, **3**, 1123-1132.
- Berra, E., Benizri, E., Ginouves, A., Volmat, V., Roux, D. and Pouyssegur, J. (2003). HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. *EMBO J.*, **22**, 4082-4090.
- Bradner, W.T. (2001). Mitomycin C: a clinical update. *Cancer Treat. Rev.*, **27**, 35-50.
- Burke, B., Eady, E.A. and Cunliffe, W.J. (1983). Benzoyl peroxide versus topical erythromycin in the treatment of acne vulgaris. *Br. J. Dermatol.*, **108**, 199-204.
- Chan, D.A., Sutphin, P.D., Denko, N.C. and Giaccia, A.J. (2002). Role of prolyl hydroxylation in oncogenically stabilized hypoxia-inducible factor-1 α . *J. Biol. Chem.*, **277**, 40112-40117.
- Chan, K.S., Carbajal, S., Kiguchi, K., Clifford, J., Sano, S. and DiGiovanni, J. (2004). Epidermal growth factor receptor-mediated activation of Stat3 during multistage skin carcinogenesis. *Cancer Res.*, **64**, 2382-2389.
- Choi, J.W., Park, S.C., Kang, G.H., Liu, J.O. and Youn, H.D. (2004). Nur77 activated by hypoxia-inducible factor-1 α overproduces proopiomelanocortin in von Hippel-Lindau-mutated renal cell carcinoma. *Cancer Res.*, **64**, 35-39.
- Cioffi, C.L., Liu, Q.X., Kosinski, P.A., Garay, M. and Bowen, B.R. (2003). Differential regulation of HIF-1 α prolyl-4-hydroxylase genes by hypoxia in human cardiovascular cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **303**, 947-953.
- Cohen, B.A. (2001). Clinical applications of new cerebrospinal fluid analytic techniques for the diagnosis and treatment of central nervous system infections. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, **1**, 518-525.
- Dequiedt, F., Van Lint, J., Lecomte, E., Van Duppen, V., Seufferlein, T., Vandenheede, J.R., Wattiez, R. and Kettmann, R. (2005). Phosphorylation of histone deacetylase 7 by protein kinase D mediates T cell receptor-induced Nur77 expression and apoptosis. *J. Exp. Med.*, **201**, 793-804.
- Ema, M., Taya, S., Yokotani, N., Sogawa, K., Matsuda, Y. and Fujii-Kuriyama, Y. (1997). A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**, 4273-4278.
- Erez, N., Milyavsky, M., Eilam, R., Shats, I., Goldfinger, N. and Rotter, V. (2003). Expression of prolyl-hydroxylase-1 (PHD1/EGLN2) suppresses hypoxia inducible factor-1 α activation and inhibits tumor growth. *Cancer Res.*, **63**, 8777-8783.
- Farkas, A., Kemény, L., Szöny, B.J., Bata-Csörgö, Z., Pivarcsi, A., Kiss, M., Széll, M., Koreck, A. and Dobozy, A. (2001). Dithranol upregulates IL-10 receptors on the cultured human keratinocyte cell line HaCaT. *Inflamm. Res.*, **50**, 44-49.
- Fang, M.Z., Kim, D.Y., Lee, H.W. and Cho, M.H. (2001). Improvement of *in vitro* two-stage transformation assay and determination of the promotional effect of cadmium. *Toxicol. In Vitro*, **15**, 225-231.
- Fraser, M., Chan, S.L., Chan, S.S., Fiscus, R.R. and Tsang, B.K. (2006). Regulation of p53 and suppression of apoptosis by the soluble guanylyl cyclase/cGMP pathway in human ovarian cancer cells. *Oncogene*, **25**, 2203-2212.
- Genestier, L., Paillot, R., Quemeneur, L., Izeradjene, K. and Revillard, J.P. (2000). Mechanisms of action of methotrexate. *Immunopharmacology*, **47**, 247-257.
- Henley, D.V. and Korach, K.S. (2006). Endocrine-disrupting chemicals use distinct mechanisms of action to modulate endocrine system function. *Endocrinology*, **147**, 25-32.
- Kang, H.J., Song, M.R., Lee, S.K., Shin, E.C., Choi, Y.H., Kim, S.J., Lee, J.W. and Lee, M.O. (2000). Retinoic acid and its receptors repress the expression and transactivation functions of Nur77: a possible mechanism for the inhibition of apoptosis by retinoic acid. *Exp. Cell Res.*, **256**, 545-554.
- Kendig, D.M. and Tarloff, J.B. (2007). Inactivation of lactate dehydrogenase by several chemicals: implications for *in vitro* toxicology studies. *Toxicol. In Vitro*, **21**, 125-132.
- Klaunig, J.E., Xu, Y., Isenberg, J.S., Bachowski, S., Kolaja, K.L., Jiang, J., Stevenson, D.E. and Walborg, E.F. Jr. (1998). The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.*, **1**, 289-295.
- Knasmüller, S., Parzefall, W., Helma, C., Kassie, F., Ecker, S. and Schulte-Hermann, R. (1998). Toxic effects of griseofulvin: disease models, mechanisms, and risk assessment. *Crit. Rev. Toxicol.*, **27**, 495-537.
- Korge, P. and Weiss, J.N. (1999). Thapsigargin directly induces the mitochondrial permeability transition. *Eur. J. Biochem.*, **265**, 273-280.
- Lee, S.K., Kim, H.J., Kim, J.W. and Lee, J.W. (1999). Steroid receptor coactivator-1 and its family members differentially regulate transactivation by the tumor suppressor protein p53. *Mol. Endocrinol.*, **13**, 1924-1933.
- Nakadate, T. (1989). The mechanism of skin tumor promotion caused by phorbol esters: possible involvement of arachidonic acid cascade/lipoxygenase, protein kinase C and calcium/calmodulin systems. *Jpn. J. Pharmacol.*, **49**, 1-9.

- Nishizuka, Y. (1984). The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*, **308**, 693-698.
- Schmidt, K.N., Traenckner, E.B., Meier, B. and Baeuerle, P.A. (1995). Induction of oxidative stress by okadaic acid is required for activation of transcription factor NF-kappa B. *J. Biol. Chem.*, **270**, 27136-27142.
- Seifried, H.E., McDonald, S.S., Anderson, D.E., Greenwald, P. and Milner, J.A. (2003). The antioxidant conundrum in cancer. *Cancer Res.*, **63**, 4295-4298.
- Seth, P.K. (1982). Hepatic effects of phthalate esters. *Environ. Health Perspect.*, **45**, 27-34.
- Tennant, R.W., Margolin, B.H., Shelby, M.D., Zeiger, E., Haseman, J.K., Spalding, J., Caspary, W., Resnick, M., Stasiewicz, S. and Anderson, B. (1987). Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from *in vitro* genetic toxicity assays. *Science*, **236**, 933-941.
- Trosko, J.E. (2001). Commentary: is the concept of "tumor promotion" a useful paradigm? *Mol. Carcinog.*, **30**, 131-137.
- Verma, A.K., Hsieh, J.T. and Pong, R.C. (1988). Mechanisms involved in ornithine decarboxylase induction by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, a potent mouse skin tumor promoter and an activator of protein kinase C. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1250**, 273-290.
- Wang, X.D. and Russell, R.M. (1999). Procarcinogenic and anticarcinogenic effects of beta-carotene. *Nutr. Rev.*, **57**, 263-272.
- Yamasaki, H. (1990). Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **11**, 1051-105.