

화학적 발암원이 Clone 9 세포의 알데히드대사 효소와 항산화 효소에 미치는 영향

김현배 · 염영나¹ · 이미영*

순천향대학교 자연과학대학 생명과학부, ¹식품의약품안전청 국립독성연구원 일반독성부

Effects of Chemical Carcinogens on the Aldehyde Metabolic Enzymes and Antioxidant Enzymes in Clone 9 Cell

Hyun Bae Kim, Young Na Yum¹ and Mi Young Lee*

Department of Life Science, Soonchunhyang University, Asan, Chungnam, Korea

¹National Institute of Toxicological Research, KFDA, Seoul, Korea

(Received June 1, 2002)

(Accepted August 13, 2002)

ABSTRACT : Chemical carcinogen-induced alterations of aldehyde metabolic enzymes were examined in clone 9 cell. Diethylnitrosamine (DENA), N-nitrosoethylurea (NEU) and N-nitrosomorpholine (NNM) were used as model carcinogens. Changes in enzyme activities by repetitive treatment of DENA, NEU or NNM were analyzed in terms of specific activities and activity stainings of the enzymes on the gel. Upon treatment of DENA, lipid peroxide level increased upto 10 fold, indicating strong oxidative stress state of the cell. Notable enhancement of ADH and ALDH activity occurred after DENA treatment, while glutathione-S-transferase activity was slightly increased. Furthermore, about 2.5 fold higher superoxide dismutase (SOD) activity was detected during deactivation of catalase (CAT) activity by repetitive treatment of DENA. However, in NEU-treated cell, about 2.3 fold higher ALDH activity was found while ADH activity was slightly increased. Notable increase of CAT and SOD could also be found. In contrast, maximum 3.5 fold higher CAT activity occurred during SOD deactivation in NNM-treated cell. These results suggest that there might be different enzymatic responses in relation to cell protection against DENA, NEU or NNM.

Key Words : Diethylnitrosamine, N-nitrosoethylurea, N-nitrosomorpholine, Lipid peroxidation, Aldehyde metabolic enzymes, Antioxidant enzymes, Clone 9 cell

I. 서 론

발암물질에 의한 암화과정은 발암개시, 발암촉진, 발암진전이라고 하는 일련의 과정으로 세분화된 다단계 반응이다(Pitot and Sirica, 1980). 발암물질을 포함한 이물질이 세포내로 흡수되면 phase I 효소에 의해서 산화-환원되게 되며, 이 과정에서 생성된 중간체들은 phase II 효소에 의해서 복합체를 형성하여 배설된다(Nebert 등, 1987). 이때 일어나는 산화-환원반응에서는 산소의 부분적인 환원으로 각종 free radical이 생성되어 지질과산화반응을 통한 지질의 자동산화를 촉진시킨다. Free radical의 생성은 세포가 산화스트레스에 놓여 있음을 의미한다. 또한 세포막을 구성하고 있는 불포화 지질성분의 이중결합과 작용하여 연쇄적인 반응을 통하여 지질과산화물을 형성하고, 이들 물

질은 세포내의 여러 기관에 독성을 유발한다. 뿐만 아니라 지질과산화반응의 중간산물인 4-hydroxynonenal 등의 각종 aldehyde가 생성되게 되므로 aldehyde 대사에 관련된 효소활성이 증가된다고 보고되어 왔다(Eckl과 Esterbauer, 1989). Aldehyde대사에 관련된 주요 효소로는 aldehyde dehydrogenase와 alcohol dehydrogenase를 들 수 있다. Aldehyde dehydrogenase(ALDH)는 세포내부 및 세포외부로부터 생성된 각종 aldehyde의 대사에 관여하는 효소로서 여러 개의 동위효소로 구성되어 있다. ALDH superfamily는 기본적인 기질특이성을 중심으로 class 1 ALDH, class 2 ALDH 및 class 3 ALDH의 3군으로 나눌 수 있다(Lindahl, 1992). 이중 cytosolic class 3 ALDH가 정상세포에서는 발현되지 않으나 암세포에서만 특이하게 발현되는 특징을 가지고 있어서 tumor-associated ALDH라고 부르기도 한다(Muzio 등, 2001). 뿐만 아니라 class 3 ALDH를 항암제에 대한 암세포의 저항성을 결정짓는 주요인자

*To whom correspondence should be addressed

로 간주하기도 한다. 랫드 간암세포의 경우 정상세포에 비하여 cytosolic class 3 ALDH가 증가한 반면 mitochondrial class 2 ALDH가 감소하였다. 이때 감소되었던 class 2 ALDH가 arachidonic acid 처리에 의하여 정상상태로 회복되었다(Canuto 등, 2001). 뿐만 아니라 간암세포에서 증가되었던 cytosolic class 3 ALDH도 antisense oligonucleotide에 의하여 억제되었다고 보고되었다(Muzio 등, 2001).

뿐만 아니라 최근 여러 종에서 ALDH superfamily의 genome 서열이 결정되었다. ALDH 유전자 superfamily는 331개의 특이적인 유전자로 구성되어 있는데 이중 158개가 진핵세포의 유전자로 확인되었다. 사람 genome에서는 17개의 functional gene과 3개의 pseudogene이 밝혀졌다. 뿐만 아니라 86개의 진핵세포 ALDH의 아미노산 서열을 재배열함으로써 진핵세포 ALDH가 20개 gene family로 구성되어 있다는 사실을 밝힐 수 있었다(Sophos 등, 2001). ALDH의 유전자 분석 뿐만 아니라 단백질분자의 molecular dynamics simulation(Wymore 등, 2001), 4차 구조(Rodriguez-Zavala와 Weiner, 2001) 및 활성자리의 입체구조도 규명되고 있다(Hempel 등, 2001). 또한 프로테옴 분석을 통하여 사람의 hepatocellular carcinomas(HCC)에서 class 3 ALDH의 변화가 수반된다고 최근 보고되는 등(Park 등, 2002), 발암화과정에 연관된 ADH와 ALDH에 관한 연구가 genome 수준에서도 심도있게 진행되고 있다.

한편 화학적 발암물질이 세포내에서 발암화과정을 유발하는 과정에서 유해 활성산소종의 생성으로 산화스트레스가 유발되게 된다. 따라서 ADH와 ALDH 뿐만 아니라 산화스트레스에 대항하는 항산화 방어효소가 활성화될 것이다. 유해 활성산소종의 양을 조절할 수 있는 항산화 효소로는 glutathione-S-transferase, superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase 등을 들 수 있다. Zhao 등(2002)에 의하면 superoxide dismutase가 결핍된 피부세포에서는 산화스트레스가 유도되었을 뿐만 아니라 초기단계 피부암 모델에서 세포사멸 및 p53이 매개하는 신호회로에 변화가 생겼다. 또한 세포내부의 항산화 방어기구를 활성화시키면 발암화 과정이 억제된다고 보고되었고(Beani, 2002), 금속에 의한 발암화와 산화스트레스와의 관련성이 제안되기도 했다(Galaris and Evangelou, 2002). 그러나 니트로 화합물에 의해 유도되는 발암화과정에서 산화스트레스와 방어관련 효소의 활성변화와의 연관성을 제시한 보고는 거의 없다.

따라서 본 실험에서는 화학적 발암물질에 의해 유발되는 세포내 발암화 과정에서 aldehyde 대사 효소와 항산화 효소 등의 방어관련 효소의 활성변화를 측정하였다. Clone 9 세포주에 N-nitrosodiethylamine(DENA), N-nitrosoethylurea(NEU), N-nitrosomorpholine(NNM)을 일정농도에서 반복적으로 처리한 후 세포내 과산화지질의 함량변

화를 측정하고, aldehyde 대사 효소와 항산화 효소의 비활성 변화를 측정하였으며 활성염색을 통한 효소분석을 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포주의 배양

본 연구에 사용한 세포주는 clone 9, SK-OV-3, SK-HEP-1, Hep G2, T24, Capan-1, DU145와 COLO 320HSR이며, 암세포주들은 한국 세포주 은행으로부터 분양 받았다. SK-HEP-1, Hep G2와 DU 145는 10% FBS가 첨가된 MEM배지, SK-OV-3와 T24는 10% FBS가 첨가된 McCoy's 5a배지, Capan-1과 COLO 320HSR은 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640배지, 그리고 Clone 9은 10% FBS가 첨가된 Ham's F12K배지를 사용하여 5% CO₂, 95% air, 37°C의 CO₂ 배양기에서 배양하였다.

2. 세포의 계대배양

액체 질소에 보관되어 있는 동결세포를 37°C 수조에서 녹인 후 10 ml의 배지와 혼합하여 4°C, 500 g에서 5분간 원심분리 후 상등액을 제거하고 5 ml의 배지에 잘 현탁한 후 25 cm² 세포 배양 플라스크에 옮겨 5% CO₂, 37°C의 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포의 계대배양은 각각의 배지에 10% FBS를 첨가한 배지를 사용하였다. COLO 320HSR과 같은 비부착성 세포의 경우 배양액을 모아 4°C, 500 g에서 5분간 원심 분리한 후 상등액을 제거하고, 5 ml의 새로운 배지에 현탁하여 세포 배양 플라스크로 분주하였다. 그 외의 세포의 경우 배양액을 제거한 후 1 ml의 trypsin-EDTA 용액을 가하여 5% CO₂, 37°C의 CO₂ 배양기에서 약 3분간 반응시킨 후 trypsin-EDTA solution에 의해 부유된 세포들을 원심분리용 튜브로 옮기고, 4°C, 500 g에서 5분간 원심 분리하여 상등액을 제거한 후 5 ml의 새로운 배지에 수확된 세포를 현탁하여 세포배양 플라스크에 분주하여 배양하였다.

3. Methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) assay

MTT 용액은 배지에 5 mg/ml의 MTT를 용해 후 살균된 여과지로 여과하여 불용성 물질을 제거한 것을 사용하였다. 세포수를 10⁴개/ml로 희석하여 96-microwell plate에 200 µl씩 분주한 뒤 5% CO₂, 37°C의 CO₂ 배양기에서 24 시간 배양하였다. 그 후 발암물질을 농도별로 첨가하여 24 시간 더 배양한 뒤 조제한 MTT solution을 20 µl/well씩 첨가하여 4시간 더 반응시키고 배지를 제거하였다. DMSO

를 50 $\mu\text{l}/\text{well}$ 씩 가하고 잘 교반하여 침전물을 완전히 용해하였다. 각 well의 흡광도는 ELISA reader를 이용하여 각 well의 570 nm에서의 흡광도를 측정하였고 background wavelength는 630 nm에서 측정하였다.

4. 화학적 발암원의 반복처리

Clone 9 세포주에 대한 N-nitrosodiethylamine(DENA), N-nitrosoethylurea(NEU), N-nitrosomorpholine(NNM)의 처리농도는 MTT assay 방법에 의해 설정된 IC_{50} (세포의 50%가 죽는 농도)농도로 결정하였다. 세포 배양 플라스크 내의 배지를 모두 제거하고 새 배지로 갈아준 후 각각의 발암물질을 24시간 동안 처리하였다. 새 배지로 갈아준 후 세포가 플라스크바닥에 80% 이상 차지할 때까지 배양하였다. 이 과정을 7회까지 반복 수행하였다.

6. 효소원의 분리

비부착성 세포의 경우 배양액을 모아 4°C, 500 g에서 5분간 원심 분리하여 세포를 모은 후 PBS로 3번 수세 후 균질화 하였으며, 그 외의 부착성 세포의 경우는 trypsin-EDTA로 처리하여 바닥으로부터 세포를 떼어 낸 후 원심 분리용 튜브에 모아 4°C, 500 g에서 5분간 원심분리 후 PBS로 3회 수세하였고 1 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoethanol을 포함한 0.1 M tris-HCl(pH 7.4) 완충용액 1 ml를 첨가하여 세포를 부유시킨 후 균질화(30초) 하였다. 균질화된 세포 혼합액을 10,000 g에서 1시간 동안 원심분리하여 상층액을 취해 효소액으로 사용하였다(Tsao 등, 1985).

7. 효소의 활성측정 및 활성염색

Alcohol dehydrogenase와 aldehyde dehydrogenase, glutathione transferase, catalase 및 superoxide dismutase 반응은 상온에서 반응 혼합액에 각각 효소액을 가하여 시작하였다(Canuto 등, 1993). 효소 1 unit은 각각의 반응조건에서 1분 동안에 1 μmole 의 기질을 생성물로 변화시키는데 필요한 효소의 양으로 정하였고, 비활성(specific activity)은 단백질 1 mg당의 효소활성(unit)으로 나타냈다. 각 효소활성은 시료당 3회씩 반복측정 후 평균과 표준편차로 나타내었다. 6% polyacrylamide electrophoresis gel을 이용하여 10 μg 의 시료를 주입하여 전개한 후 각각 활성염색하였다.

8. 지질 과산화물 함량 측정

지질 과산화물 함량은 thiobarbituric acid(TBA) 방법을

이용하여 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 함량을 측정하였고, 1% sulfuric acid를 용매로 한 10 mM TMP를 표준용액으로 사용하였다(Kim 등, 1999).

III. 결과 및 고찰

1. 화학적 발암원에 의한 aldehyde 대사 효소의 활성 변화

간에서 aldehyde대사를 수행하는 효소로는 aldehyde dehydrogenase, aldehyde reductase와 alcohol dehydrogenase가 있다. Aldehyde dehydrogenase(ALDH)의 경우 그 활성변화를 세포의 발암화과정과 연결시켜 설명하고 있으며, 특히 preneoplastic cell에서 neoplastic cell로의 형질전환의 표지인자로 ALDH의 활성증가를 이용하기도 한다. ALDH의 활성증가는 정상세포에서는 발현되지 않는 tumor-specific class III ALDH 유전자의 발현에 기인한다고 알려졌다(Canuto 등, 2001). Alcohol dehydrogenase (ADH)는 넓은 기질특이성을 가지고 있어서 각종 aliphatic aldehyde와 aromatic aldehyde를 alcohol로 전환시킬 수 있는데 특히 간 발암화 과정에서 ADH의 활성이 증가한다고 보고되어 있다. 따라서 aldehyde대사에 관련된 효소의 활성증가는 외부 또는 내부요인에 의해 생성된 aldehyde 뿐만 아니라 지질과산화반응에 의해 생성된 aldehyde에 대해 세포를 방어하기 위한 기작과 관련이 있다. 뿐만 아니라 산화스트레스에 대한 세포의 방어기작의 일부분으로 이해하기도 한다.

N-nitrosodiethylamine(DENA), N-nitrosoethylurea(NEU), N-nitrosomorpholine(NNM) 등의 발암성 nitrosamine은 genotoxic carcinogen으로 nitrosodimethylamine, 2-acetylaminofluorene, aflatoxin B₁ 등과 비슷한 방법으로 세포 내에서 친전자체로 대사된다고 알려져 있다. 최근 발암성 nitrosamin 중 DENA가 매우 효과적인 발암개시원(initiator)으로 작용한다고 보고되었으며(Brown-Peterson 등, 1999), 이미 발암개시된 세포에서 발암촉진작용을 하지는 않을 것으로 생각되고 있다(Hasegawa 등, 1998). 화학적 물질에 의한 간 발암화 과정에서 병소나 결절과 같은 전암성 병변은 특정 효소의 염색성 변화를 특징으로 한다. 예를 들면 glucose-6-phosphatase, ATPase의 활성감소와 γ -glutamyl transpeptidase, DT-diaphorase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, epoxide hydrolase 등의 활성 증가를 볼 수 있다(Hacker 등, 1982; Grisham 등, 1984). 또한 증식성이 강한 결절에서도 pyruvate kinase의 활성 증가가 보고되어 있다(Sato 등, 1978; Imai 등, 1979).

Fig. 1과 Fig. 2에서는 각각 DENA, NEU, NNM의 반복

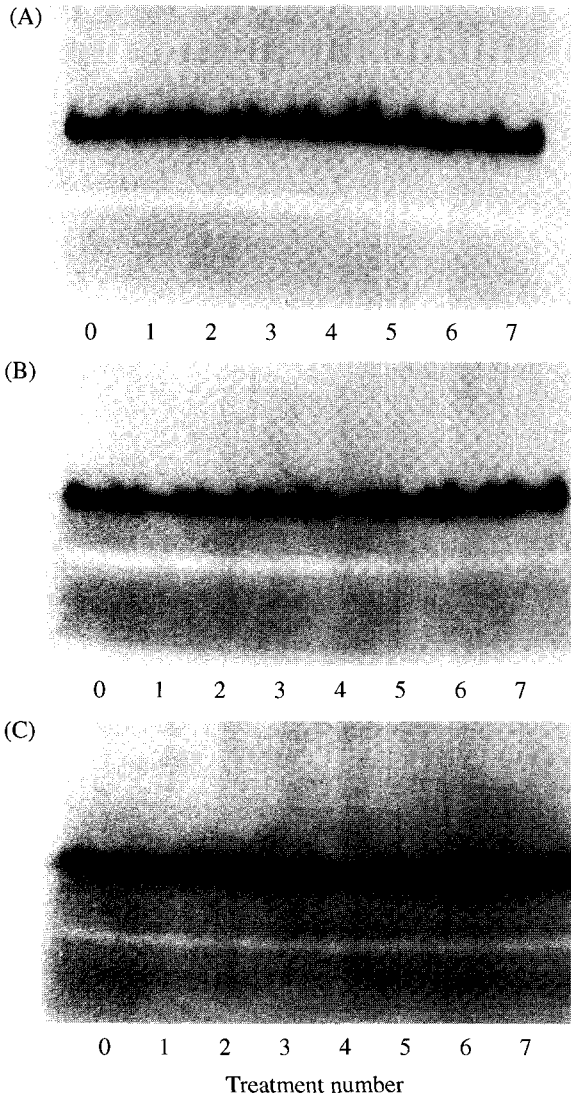


Fig. 1. Changes of alcohol dehydrogenase activity (ADH) in clone 9 cell by repetitive treatment of various chemical carcinogens. (A) diethylnitrosamine-treated cell (B) N-nitrosoethylurea-treated cell (C) N-nitrosomorpholine-treated cell.

처리가 clone 9 세포의 ADH와 ALDH의 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 발암물질의 반복처리에 따른 ADH와 ALDH의 활성변화를 활성염색을 통하여 보여주고 있으며, 발암원의 반복처리에 따른 ADH와 ALDH 활성증가가 염색 띠의 강도와 일치하게 증가함을 확인할 수 있다. MTT assay에 의하여 DENA, NEU와 NNM에 의하여 clone 9 세포의 50%가 사멸하는 농도인 IC50를 결정한 결과 각각 40 mM, 6.25 mM, 15 mM이었다(결과 미제시). DENA에 의한 간세포의 산화스트레스와 ADH와 ALDH의 활성변화는 농도별 처리군보다 반복 처리군에서 현저하게 나타났다(Kim 등, 1999). 따라서 본 연구에서도 40 mM DENA, 6.25 mM NEU, 15 mM NNM을 clone 9 세포에 최대 7회

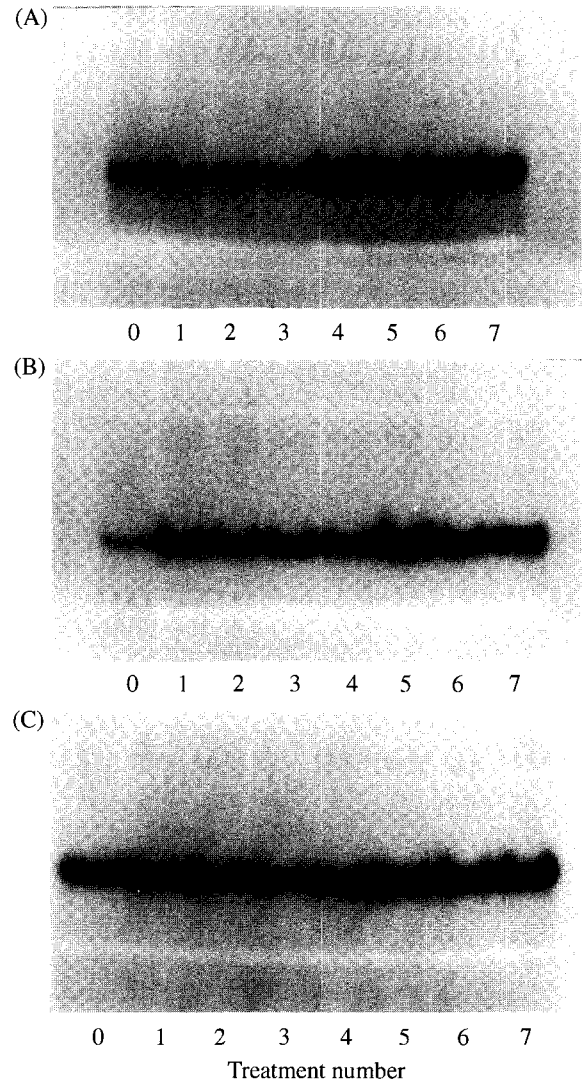


Fig. 2. Changes of aldehyde dehydrogenase activity (ALDH) in clone 9 cell by repetitive treatment of various chemical carcinogens. (A) diethylnitrosamine-treated cell (B) N-nitrosoethylure-treated cell (C) N-nitrosomorpholine-treated cell.

까지 반복처리한 후 ADH와 ALDH의 활성을 측정하였다. 40 mM DENA를 7회 반복처리한 경우 ADH의 활성이 대조군에 비하여 약 2.5배 증가하였고 ALDH의 활성이 약 2배 증가하였다. 6.25 mM NEU를 반복처리했을 때 ADH의 활성 증가는 미미하였으나 ALDH는 7회 반복처리군의 경우 약 2.3배 증가하였다. 15 mM NNM을 처리한 경우 ADH의 활성은 최대 2배 증가하였고 ALDH의 활성은 최대 1.7배 증가하였다.

이와 같은 aldehyde 대사관련효소의 현저한 증가는 발암물질의 반복처리로 인해 생성된 세포내 aldehyde를 무독화 시키기 위한 대사과정으로서 endogenous하게 생성되거나 지질 과산화반응에 의해 생성된 aldehyde의 독성에

대해 세포를 방어하기 위한 기작일 뿐만 아니라 oxidative stress에 대한 세포반응의 일부분으로 생각된다(Canuto 등, 1993). 실제로, 랫드 간암 세포주(Lin 등, 1984; Mitchell과 Petersen, 1987) 뿐만 아니라 여러 간 발암화 과정모델(Feinstein과 Cameron, 1972; Lindahl, 1977)과 사람의 대장암 내에서도(Marselos와 Michalopoulos, 1987) 정상조직보다 더 높은 ALDH 활성이 보고된 바 있다. 특히 사람의 간암 등에서 class 3 ALDH의 현격한 증가가 보고되었다(Park 등, 2002). ADH의 경우 암세포와 정상세포의 세포내 활성분포를 비교했을 때 간암세포에서는 ADH가 cytosol에 존재하는데 비해 정상세포에서는 세포전체에 균등분포 하였다. 뿐만 아니라 DENA 처리에 의한 랫드 간 발암화 과정에서 특히 ADH의 활성변화가 타 효소에 비하여 미미하다고 보고 된 바 있다(Canuto, 1993). 본 연구팀의 선행 연구결과에서도 DENA의 농도를 70 mM까지 증가시켰을 때도 ADH의 활성증가가 미미하였을 뿐만 아니라 오히려 감소하기도 하였다(Kim 등, 1999).

2. 화학적 발암원에 의한 지질 과산화물의 함량 증가

발암원에 의하여 정상세포가 암세포로 형질전환되는 과정에서 활성산소종이 생성되고 이로 인한 지질과산화반응이 촉진되면 세포는 산화스트레스(oxidative stress)에 놓이게 된다. 세포내 주요한 활성산소종으로는 superoxide anion($\cdot O_2$), hydrogen peroxide(H_2O_2), hydroxyl radical($\cdot OH$), singlet oxygen(1O_2) 등이 있다. 고농도의 활성산소종은 화학적 반응성과 산화력이 강력하여 세포내 다양한 부위에 심각한 손상을 주게 된다. 따라서 지질과산화반응은 세포의 산화스트레스의 척도로도 널리 사용되고 있다. DENA, NEU, NNM의 반복투여로 인한 세포내 지질과산화물의 함량을 측정된 결과(Table 1), DENA 반복

Table 1. Effect of DENA, NEU and NNM on the lipid peroxidation levels in terms of TBA content. The values are expressed as mean \pm S.D. by triple determination of the four different samples

Carcinogen	Treatment number	Lipid peroxidation level
DENA*	1	175 \pm 2.4
	3	180 \pm 3.5
	5	900 \pm 10.2
	7	1000 \pm 9.9
NEU	1	250 \pm 3.5
	3	300 \pm 1.7
	5	320 \pm 5.4
	7	350 \pm 3.7
NNM	1	125 \pm 4.2
	3	150 \pm 5.7
	5	150 \pm 2.5
	7	200 \pm 3.7

*Data were modified from previous paper (Kim *et al.*, 1999).

투여군의 경우 대조군에 비하여 지질과산화물의 함량이 최대 10배까지 증가하였다. NEU 반복처리에 의한 지질과산화물의 함량은 대조군보다 최대 3.5배 증가하였고 NNM 처리에 의하여 최대 2배의 지질과산화물의 함량증가를 보였다. 이러한 결과는 발암원에 의한 지질과산화물의 현격한 증가로 인하여 세포가 심각한 산화스트레스 상태에 놓여 있음을 뜻하며, 산화스트레스에 대한 항산화 방어효소가 활성화 될 것을 의미하기도 한다.

3. 화학적 발암원에 의한 항산화효소의 활성변화

유해 활성산소종의 양을 조절할 수 있는 세포내 항산화 방어기구로는 glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase 등의 항산화 효소와 ascorbic acid, α -tocopherol, glutathione 등의 항산화제를 들 수 있다. 항산화 효소들은 주로 환원제를 기질로 사용하여 활성산소에 전자를 줌으로써 무독화반응을 촉매하는 반면, 항산화제는 항산화효소의 기질로 사용되거나 직접 활성산소종과 반응하여 그 양을 조절한다. 이중 glutathione-S-transferase(GST)는 Se-비의존적 peroxidase 활성을 지니고 있어 지질 과산화물 제거반응에 관여할 수 있게 되므로 세포내 방어반응에 참여한다고 알려져 있다(Farber, 1984). 뿐만 아니라 쥐의 화학적 간암 유도과정에서 정상 간 조직에서는 발현되지 않고 간암의 전암성 병소에서만 현저히 높게 발현되는 것이 밝혀져 전암성 병소의 지표로서 유용하게 쓰이고 있다(Rushmore와 Faber, 1987).

Table 2에서는 DENA, NEU, NNM의 반복처리에 의한 항산화효소의 활성변화를 측정하였다. DENA 처리군의

Table 2. Effect of DENA, NEU and NNM on the activities of various antioxidant enzyme from rat liver cell. The values are expressed as mean \pm S.D. by triple determination of the four different samples

Carcinogen	Treatment number	Glutathione transferase	Catalase	Superoxide dismutase
DENA*	1	120 \pm 1.9	100 \pm 2.3	130 \pm 4.7
	3	130 \pm 1.4	120 \pm 1.7	180 \pm 2.5
	5	120 \pm 2.0	80 \pm 2.5	200 \pm 3.9
	7	124 \pm 2.1	90 \pm 3.1	250 \pm 1.2
NEU	1	105 \pm 3.7	120 \pm 1.7	114 \pm 4.5
	3	112 \pm 1.5	120 \pm 2.5	120 \pm 3.7
	5	108 \pm 1.9	105 \pm 3.6	124 \pm 4.1
	7	108 \pm 2.5	180 \pm 3.9	129 \pm 1.9
NNM	1	107 \pm 4.7	100 \pm 2.8	135 \pm 3.5
	3	105 \pm 5.5	320 \pm 4.1	135 \pm 3.5
	5	110 \pm 2.9	350 \pm 3.5	110 \pm 2.9
	7	108 \pm 1.7	345 \pm 3.8	95 \pm 3.2

*Data were modified from previous paper (Kim *et al.*, 1999).

경우 전반적으로 전암성 병변의 지표로 사용되는 GST의 활성증가가 약 20~30%로 미미하였다. 특히 DENA 7회 반복처리군의 경우 지질과산화물의 함량은 약 10배 증가한 데 비해(Table 1), GST의 활성증가율은 약 24%에 불과하였다. 뿐만 아니라 세포내 활성산소종인 hydrogen peroxide의 소거반응에 직접 참여할 수 있는 catalase의 활성은 오히려 10%가 감소하였다. 이에 비해 SOD의 활성은 현격하게 증가하여 대조군의 약 2.5배에 달하였다. 이러한 결과는 DENA의 반복처리로 인해 현격하게 증가한 활성산소종과 과산화지질에 대한 방어기작에 특히 SOD의 활성증가가 주요한 역할을 할 가능성을 제시한다. NEU 반복처리군의 경우 GST의 활성증가는 DENA 처리군과 마찬가지로 미미하였으나, catalase의 활성이 최대 1.8배 증가하였고 SOD도 전반적으로 증가하였다. NEU 반복처리에 의한 지질과산화물의 함량은 대조군보다 최대 3.5배 증가한 바 있다. NNM 처리군에서는 GST의 활성증가는 미미하였으나 catalase의 활성은 3회 반복처리군부터 약 3배 이상 증가하였다. 이에 비해 SOD의 활성은 약간 감소하는 경향을 나타냈다. 이러한 결과는 NNM 처리에 의해 유도된 세포내 산화스트레스에 대한 방어반응에 catalase가 주로 관여할 가능성을 보여준다. 따라서 DENA, NEU, NNM의 반복처리에 대한 세포내 GST의 활성변화는 미미하지만 지질과산화물의 함량증가와 항산화효소의 활성변화가 현저하다는 결과를 통해 니트로화합물의 반복처리에 따른 clone9 세포의 발암화가 매우 초기단계에 머물러 있을 것으로 추측할 수 있다. 또한 니트로화합물의 종류에 따라 세포내에서 활성화되는 항산화효소의 종류가 서로 다르다는 결과를 통해 서로 다른 항산화 방어기작이 존재할 가능성도 배제할 수 없다.

4. Clone 9 세포와 사람 암세포주의 ADH와 ALDH 활성 및 패턴 비교

각종 스트레스와 발암물질 처리 등의 특수한 생리조건에서 효소의 총 비활성의 변화와 동위효소의 패턴 변화는 특수 생리조건의 지표로 사용되어 왔다. 효소의 총 비활성은 그 효소를 구성하는 특정 동위효소의 유도 혹은 소멸로 인하여 변화된다. 따라서 랫드 간 세포 뿐만 아니라 사람 암세포주에서 ADH와 ALDH의 총 비활성을 서로 비교할 뿐만 아니라(Table 3), 이 효소들의 동위효소 패턴의 비교 분석은 매우 의미있는 일이 될 수 있다(Fig. 3). 이때 사용한 세포주는 SD 랫드의 간장에서 유래한 clone 9 세포주와 각각 사람의 난소암, 간암, 방광암, 췌장암, 전립선암, 결장암 세포주인 SK-OV-3, SK-HEP-1, Hep G2, T24, Capan-1, DU145와 COLO 320HSR이었다. Table 3에서 보듯이 SK-HEP-1과 COLO 320HSR의 ADH 비활성은

Table 3. Comparisons of relative specific activities of alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) from rat liver clone 9 cells and various human cancer cells. The values are expressed as means of the triple experiments

Cell	ADH (%)	ALDH (%)
Clone 9*	100	100
SK-Hep 1	273	78
HepG 2	159	85
Sk-OV-3	38	15
T-24	120	42
DU 145	143	207
COLOR 320 HSR	284	34
Capan-1	27	31

*Data were modified from previous paper (Kim *et al.*, 1999).

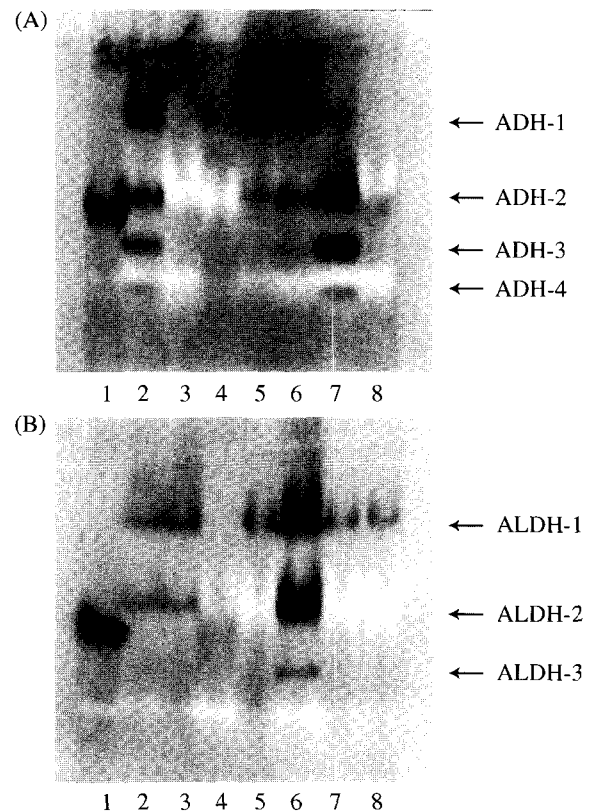


Fig. 3. Comparisons of the isozyme profiles of alcohol dehydrogenase (A) and aldehyde dehydrogenase (B) from rat liver clone 9 cell and human cancer cell lines. Lane 1: clone 9, lane 2: SK-HEP-1, lane 3: Hep G2, lane 4: SK-OV-3, lane 5: T24, lane 6: DU145, lane 7: COLO 320HSR, lane 8: Capan-1.

clone 9 보다 약 3배 높았다. 이에 비해 ALDH의 경우 DU145의 활성만이 clone 9 보다 약 2배 높은 반면 나머지 세포주의 ALDH 비활성도는 clone 9 세포주보다 오히려 낮았다. Fig. 3에서 ADH 활성염색을 통한 동위효소 패턴을 살펴보면 clone 9 세포의 ADH와 ALDH는 동위효소가 없는 단일효소이며 사람의 암세포주와는 전기적 이동 거리가 다름을 알 수 있다. SK-HEP-1과 COLO 320HSR

은 ADH-1, ADH-2, ADH-3와 ADH-4의 4개의 동위효소로 구성되어 있다. 이때 ADH-1에서 ADH-4로 갈수록 이 동속도가 빠름을 뜻한다. 또한 DU 145는 ADH-1, ADH-2, ADH-3의 3개의 동위효소로 구성되어 있음을 알 수 있다. 다른 사람 세포주에 비하여 SK-HEP-1과 COLO 320HSR의 ADH 비활성이 특히 높은 이유는 동위효소 ADH-2와 ADH-3의 활성증가에 기인함을 알 수 있다.

ALDH의 동위효소 패턴을 살펴보면 SK-HEP-1과 Hep G2가 ALDH-1과 ALDH-2의 2개의 동위효소로 구성되어 있고 DU 145가 ALDH-1, ALDH-2, ALDH-3의 3개의 동위효소로 구성되어 있었다. DU145의 높은 ALDH 비활성이 주로 ALDH-2의 현저한 증가와 함께 다른 사람 암세포주에는 존재하지 않는 ALDH-3의 유도에 의한 것임을 알 수 있다. ADH와 ALDH 동위효소 분석결과는 랫드와 사람 세포주 사이에 종간의 특이성이 있을 뿐만 아니라, 세포주마다 ADH와 ALDH 동위효소의 패턴이 서로 다름을 보여준다.

감사의 글

본 연구는 순천향대학교의 연구비 지원(2002년)으로 일부 수행되었습니다.

참고문헌

- Beani, J.C. (2001): Enhancement of endogenous anti-oxidant defenses: a promising strategy for prevention of skin cancers. *Bull. Acad. Natl. Med.*, **185**, 1507-1525.
- Brown-Peterson, N.J., Krol, R.M., Zhu, Y. and Hawkins, W.E. (1999): N-nitrosodiethylamine initiation of carcinogenesis in japanese medaka (*Oryzias latipes*): hepatocellular proliferation, toxicity and neoplastic lesions resulting from short term, low level exposure. *Toxicol. Sci.*, **50**, 186-194.
- Canuto, R.A., Ferro, M., Salvo, R.A., Bassi, A.M., Trombetta, A., Maggiora, M., Martinasso, G., Lindahl, R. and Muzio, G. (2001): Increase in class 2 aldehyde dehydrogenase expression by arachidonic acid in rat hepatoma cells. *Biochem. J.*, **357**, 811-818.
- Canuto, R.A., Muzio, G., Maggiora, M., Biocca, M.E. and Dianzani, M.U. (1993): Glutathione-S-transferase, alcohol dehydrogenase and aldehyde reductase activities during diethylnitrosamine-carcinogenesis in rat liver. *Cancer Letters.*, **68**, 177-183.
- Eckl, P. and Esterbauer, H. (1989): Genotoxic effects of 4-hydroxynonenal. *Adv. Biosci.*, **76**, 141-146.
- Farber, E. (1984): The multistep nature of cancer development. *Cancer Res.*, **44**, 4217-4223.
- Feinstein, R.N. and Cameron, E.C. (1972): Aldehyde dehydrogenase activity in a rat hepatoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 1140-1146.
- Gelboin, H.V. (1969): A microsome-dependent binding of benzo(a)pyrene to DNA. *Cancer Res.*, **29**, 1272-1276.
- Galaris, D. and Evangelou, A. (2002): The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **42**, 93-103.
- Grisham, J.W., Smith, J.D. and Taso, M.S. (1984): Colony forming ability in calcium-poor medium *in vitro* and tumorigenicity *in vivo* are not closely coupled in clones of transformed rat hepatic epithelial cell. *Cancer Res.*, **44**, 2831-2834.
- Hacker, H.J., Moore, M.A., Mayer, D. and Bannasch, P. (1982): Correlative histochemistry of some enzyme of carbohydrate metabolism in preneoplastic and neoplastic lesion in the rat liver. *Carcinogenesis*, **3**, 1265-1272.
- Hasegawa, R., Futakuchi, M., Mizoguchi, Y., Yamaguchi, T., Shirai, T., Ito, N. and Lijinsky, W. (1998): Studies of initiation and promotion of carcinogenesis by N-nitroso compounds. *Cancer Lett.*, **123**, 185-191.
- Hempel, J., Kuo, I., Perozich, J., Wang, B.C., Lindahl, R. and Nicholas, H. (2001): Aldehyde dehydrogenase. Maintaining critical active site geometry at motif 8 in the class 3 enzyme. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 722-726.
- Imai, F., Takaya, S., Hatayama, I., Sato, T., Ito, N. and Sato, K. (1979): Rat hyperplastic hepatic nodules and primary hepatomas retaining abnormally high pyruvate kinase L type activity. *Enzyme*, **24**, 313-321.
- Kim, H.B., Yum, Y.N. and Lee, M.Y. (1999): The changes of enzyme activities during diethylnitrosamine-induced carcinogenesis of cultured rat liver cell. *J. Toxicol. Pub. Health*, **15**, 183-190.
- Lindahl, R. (1977): Aldehyde dehydrogenase in 2-acetaminofluorene-induced rat hepatomas. *Biochem J.*, **164**, 119-123.
- Lindahl, R. (1992): Aldehyde dehydrogenase and their role in carcinogenesis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **27**, 283-290.
- Lin, K.H., Winters, A.L. and Lindahl, R. (1984): Regulation of aldehyde dehydrogenase activity in five rat hepatoma cell lines. *Cancer Res.*, **44**, 5219-5226.
- Marselos, M. and Michalopoulos, G. (1987): Changes in the pattern of aldehyde dehydrogenase activity in primary and metastatic adenocarcinomas of the human colon. *Cancer Letters.*, **34**, 27-37.
- Mitchell, D.Y. and Petersen, D.R. (1987): The oxidation of α,β unsaturated aldehydic products of lipid peroxidation by rat liver aldehyde dehydrogenase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **87**, 403-410.
- Muzio, G., Canuto, R.A., Trombetta, A. and Maggiora, M. (2001): Inhibition of cytosolic class 3 aldehyde de-

- hydrogenase by antisense oligonucleotides in rat hepatoma cells. *Chem. Biol. Interact.*, **130-132**, 219-225.
- Nebert, D.W., Jaiswal, A.K., Meyer, U.A. and Gonzalez, F.J. (1987): Human P-450 genes : evolution, regulation and possible role in carcinogenesis. *Biochem. Soc. Trans.*, **15**, 586-589.
- Park, K.S., Cho, S.Y., Kim, H. and Paik, Y.K. (2002): Proteomic alterations of the variants of human aldehyde dehydrogenase isozymes correlate with hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer*, **97**, 261-265.
- Pitot, H.C. and Sirica, A.E. (1980): The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis. *Biochem. Biophys. Acta.*, **605**, 191-215.
- Rodriguez-Zavala, J. and Weiner, H. (2001): Role of the C-terminal tail on the quaternary structure of aldehyde dehydrogenases. *Chem. Biol. Interact.*, **130**, 151-160.
- Rushmore, T.H. and Faber, E. (1987): Identification of a characteristic cytosolic polypeptide of rat preneoplastic hepatocyte nodules as placenta glutathione-S-transferase. *Biochim. Biophys. Res. Com.*, **143**, 98-103.
- Sato, K., Takaya, S., Imai, F., Hatayama, I. and Ito, N. (1978): Different deviation patterns of carbohydrate-metabolizing enzymes in primary rat hepatomas induced by different chemical carcinogens. *Cancer Res.*, **38**, 3086-3093.
- Sophos, N.A., Pappa, A., Ziegler, T.L. and Vasilidou, V. (2001): Aldehyde dehydrogenase gene superfamily : the 2000 update. *Chem. Biol. Interact.*, **130**, 323-337.
- Tsao, M.S., Grisham, J.W., Nelson, K.G. and Smith, J.D. (1985): Phenotypic and karyotypic changes induced in cultured rat hepatic epithelial cells that express the "oval" cell phenotype by expose to N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Am. J. Pathol.*, **118**, 306-315.
- Wymore, T., Nicholas, H.B. and Hempel, J. (2001): Molecular dynamics simulation of class 3 aldehyde dehydrogenase. *Chem. Biol. Interact.*, **30**, 201-207.
- Zhao, Y., Oberley, T.D., Chaiswing, L., Lin, S.M., Epstein, C.J., Huang, T.T. and St Clair, D. (2002): Manganese superoxide dismutase deficiency enhances cell turnover via tumor promoter-induced alternations on AP-1 and p53-mediated pathways in a skin cancer model. *Oncogene*, **21**, 3836-3846.