

[報 文]

Benzoazole계 화합물이 glutathione-S-transferases의 유도발현에 미치는 영향

서경원 · 김연정 · 조민경* · 김태완 · 김상건* · 김효정

식품의약품안전청 국립독성연구소 독성부, *덕성여자대학교 약학대학

The Expression of Rat Hepatic Glutathione-S-Transferases by Benzoazoles

Kyung Won Seo, Yeon Jung Kim, Min Kyung Cho*
Tae Wan Kim, Sang Geon Kim* and Hyo Jung Kim

*Department of Toxicology, National Institute of Toxicological Research,
Korea Food and Drug Administration, 5, Nokbun-dong, Eunpyung-gu, Seoul 122-020,
Korea *College of Pharmacy, Duksung Women's University, 419, Ssangmun-dong,
Tobong-ku, Seoul 132-714, Korea*

ABSTRACT

Glutathione-S-transferases (GSTs) detoxify electrophilic xenobiotics and reactive metabolites. Recently benzene-fused heterocycles have been shown to increase the total amount of hepatic GSTs in rats. Primarily this study aimed to determine the induction of GSTs by benzoazoles (BAs) including benzoxazole (BX), 2-methylbenzoxazole (M-BX), 2,5-dimethyl benzoxazole (D-BX), benzothiazole (BT), aminobenzothiazole (A-BT) and 2-mercaptobenzothiazole (M-BT) in rats. Hepatic cytosol and poly(A)⁺ mRNA were prepared from rats after oral administration of BX, BT, M-BX, D-BX, A-BT and M-BT for 5 consecutive days at doses of 1mmol/kg. Western immunoblot and northern blot analysis were conducted with rabbit anti-GST Ya, Yb₁, Yb₂, Yc antibodies and cDNA probes containing ≈ 500bps in the specific coding regions of Ya, Yb₁, Yb₂, Yc₁ and Yc₂, respectively. All BAs increased the amount of enzymes and mRNA levels of GSTs. BT was the most effective inducer of GSTs among the compounds examined in this study. Although A-BT and M-BT, the derivatives of BT, induced GSTs, these chemicals had lesser effect on induction of GSTs than BT. The derivatives of BX also induced less GSTs than the parent compound and the addition of methyl group to the benzene ring of BX reduced the induction of GSTs. BAs had better inductive effects on the class α (Ya, Yc) than class μ GSTs (Yb₁, Yb₂). BAs enhanced mRNA levels of GSTs in parallel with the protein levels. These results indicate that 1) most of BAs induced various isozymes of GSTs, 2) the induction of GSTs appears to be correlated with the chemical structure of the derivatives, and 3) the expression of GST by BAs is presumably under the transcrip-

tional regulation.

Key words : glutathione-S-transferases, benzoazoles, rat

서 론

화학물질 및 약물이 생체내로 흡수되면 xenobiotics로 인식되고 생체내 효소계를 통해 대사되어 배설 및 해독화의 방어작용을 거치게 된다. 대사란 일반적으로 지용성 이물질이 극성이 높고 배설이 용이한 화합물로 변환되는 것을 의미하지만, 대사효소계에 의해 오히려 독성이 강한 대사체를 생성하며 이들중에는 변이원, 최기형원 및 발암원 등이 포함된다.

Glutathione-S-transferases (GSTs)는 phase II 반응 효소계에 존재하며 glutathione (GSH)을 다양한 electrophilic xenobiotics에 포함시키는데 관여하는 핵심효소로서 cytochrome P-450계에 의해 형성된 활성대사체를 GSII로 포함시키는 해독화 경로에서 매우 중요한 역할을 한다. 이 효소는 간에 높은 농도로 존재하므로 혈장 중의 농도가 간 손상의 민감한 지표로서 사용될 수 있고, 어떤 isozyme의 expression은 특정장기에 제한되므로 혈장 중의 효소 활성을 측정함으로써, 특정 장기손상의 추정 가능성이 조직상해의 marker로 사용될 수 있다.¹⁾

랫드, 마우스 및 사람에서 GSTs는 촉매활성과 면역화학적 성질, 그리고 cDNA subunit clones의 sequencing을 통한 일차구조에 의해 α , μ 및 π 등의 isozymes로 나뉜다. 이들은 Ya/Yc, Yb (Yb₁, Yb₂), Yp 등의 subunit들이 각각의 subfamily에 속하며 cytosolic form은 heterodimer 또는 homodimer로 존재한다.²⁾ 최근에는 GSTs의 네 번째 cytosolic family인 θ 가 규명되었다.^{3,4)} GST isozymes 중 subunit Ya와 Yc는 α class에 속하며, subunit Yb₁, Yb₂는 μ class로 구분되어 존재한다. 보고에 따르면, 랫드의 간에 있는 GST isozymes은 phenobarbital, 3-methylcholanthrene 및 BHA, BHT 등 항산화제와 같은 여러 화학물질들에 의해 유도되며, 그 유도정도와 양상은 서로 다르다고 한다.⁵⁻⁷⁾

Benzoazole (BA)계 화합물은 azole계 화합물에

benzene이 융합되어 질소, 황 또는 산소를 함유한 이환형 구조로서, 여러종류의 식물, 담배잎, 담배연기에 함유되어 있다.⁸⁻¹⁰⁾ 이들은 커피, 식품 등에 존재할 뿐 아니라 공업용으로도 널리 쓰이고 있으며, 항진균작용, 구충작용, 면역증강작용 등을 하는 것도 있다고 알려져 있다. 이처럼 BA계 약물의 활용범위가 넓은 반면 이들이 체내의 약물대사효소에 미치는 영향에 관한 연구는 극히 미약하다. 따라서 이들 benzene이 융합된 화합물이 화합물의 구조적 변화와 크기 및 분자량의 차이 등에 따라 생체대사효소발현에 어떤 영향을 미치고 변화하는가를 알아보는 것은 매우 흥미로우며, 약물개발의 기초자료를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

최근 benzene-fused heterocycles계 화합물이 GSTs를 유도한다는 보고가 있었으며,¹⁰⁾ 이에 본 연구에서는 benzene-fused heterocycles계 화합물 중 BA계 화합물의 유도체들이 GSTs의 유도에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 본 시험에서 사용한 BA계 시험물질은 이미 GSTs 유도효과가 있는 것으로 보고된 benzoxazole (BX)의 유도체 중 커피, 담배, 담배연기에 공통으로 함유되어 있는 2-methylbenzoxazole (M-BX)과 담배구성 성분에서

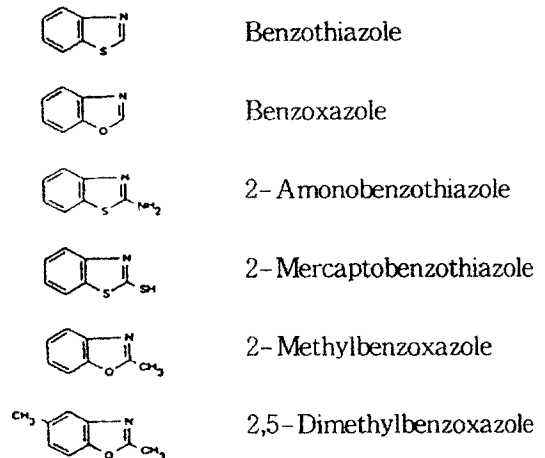


Fig. 1. Chemical Structures of the benzoazoles.

최근 발견된 메틸기가 하나 더 첨가된 2,5-dimethylbenzoxazole (D-BX)을 사용하여 GSTs의 유도효과를 조사 비교하였다. 또한 GSTs 유도효과가 큰 것으로 보고된 benzothiazole (BT)의 유도체 중 아조염료합성에 쓰이는 aminobenzothiazole (A-BT)과 고무경화가속제로 사용되는 2-mercaptobenzothiazole (M-BT)에 대한 GSTs 유도효과를 관찰하여 구조변화에 따른 GSTs 유도발현의 변화 양상을 알아보고자 하였다 (Fig. 1).

재료 및 방법

1. 시 약

BT, BX, A-BT, M-BT, M-BX, D-BX은 Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA)에서 구입하였다. 일차항체로 사용한 GST isozymes 항체는 Biotrin International (Dublin, Ireland)로부터 구입한 것이며, 이차항체로 사용한 biotinylated goat anti-rabbit IgG는 Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다.

2. 동물처치

식품의약품안전청 실험동물실에서 생산된 Sprague-Dawley계 웅성 랫드(180~210g)에 1mmol/kg 용량으로 BT, BX, A-BT, M-BT, M-BX 및 D-BX를 50% propylene glycol에 용해시켜 5일간 매일 경구투여하였다. 실내온도 23±1°C에서 1주일간 사육하여 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였고 물과 고형사료를 자유로이 공급하였다.

3. Cytosol 분리와 단백질 정량

개복후 간 정맥을 먼저 절개하여 방혈치사 시킨 후 간을 적출하였다. 적출한 간의 3배 용량에 해당하는 0.1 M Tris-KCl buffer (0.1 M Tris acetate, 0.1 M KCl, 1 mM EDTA, pH 7.4)에 간을 넣고 가위로 잘게 세절한 후 분쇄하였으며, 이때 3마리 랫드의 간조직을 1 pool로 세절시켰다. 분쇄된 조직을 high speed centrifuge (Beckman, J2-21M/E Centrifuge)를 이용하여 8000g에서 30분간 원심분리한 후 그 상등액을 취하고 ultra speed centrifuge (Centrikon T-2080, Kontron Instrument)을 이용하여 100,000g에서 90분간 원

심분리시켜 그 상등액인 cytosol을 분리하였다. 분리한 cytosol은 분주하여 사용하기 전까지 -70°C에서 보관하였으며, 모든 조작은 4°C 이하에서 실시하였다. 단백질 정량은 bovine- γ -globulin을 표준물질로 Bio-Rad protein assay kit를 이용하여 Lowry법¹¹⁾에 따라 정량하였다.

4. 전기영동 및 Western blot analysis

Laemmli 방법¹²⁾에 따라 SDS-PAGE의 12% gel을 만들고 sample은 sample buffer와 섞은 후 95°C에서 4분간 변성시켰으며, 20 μ g의 단백질을 loading하여 전기영동을 수행하였다.

면역화학적 분석은 Davis 방법¹³⁾에 따라 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 gel을 nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA)에 transfer 시킨 후 5% 탈지유 (Difco lab, USA)로 blocking하고 GST 항체 (1 : 1000)를 가하여 1시간 상온에서 반응시켰다. Membrane을 세척 후 biotinylated goat anti-rabbit IgG를 넣어 역시 30분동안 상온에서 반응시킨 후 발색을 위해 immunoperoxidase system인 ABC solution (Vector Laboratories, CA, USA)을 넣어 역시 30분 정도 반응시켰다. DAB-Ni kit (Vector Laboratories, CA, USA)를 가하여 발색시키고 증류수로 세척하여 반응을 중지시킨 후 건조하였다.

5. RNA 분리 및 Northern blot analysis

Total RNA 분리는 Cathala 등¹⁴⁾ 및 Chomczynski와 Sacchi¹⁵⁾ 방법이 Puissant와 Houdebine¹⁶⁾에 의해 수정된 thiocyanate-phenol-chloroform RNA 추출법에 따랐다. Poly(A)⁺ mRNA는 oligo (dT)-cellulose column을 사용하여 total RNA로부터 분리하였다.¹⁷⁾ 추출된 RNA의 양은 UV spectrophotometer로 260 nm에서 측정하여 계산하였다.

분리한 poly(A)⁺ mRNA 30 μ g을 1% agarose gel에서 전기영동하고, nitrocellulose filter에 transfer 시켜 42°C에서 2시간동안 prehybridization하고 ³²P-dCTP로 표지된 cDNA probe로 hybridization을 시켰다. Probe는 GST isozymes 각 유전자의 coding region 중 특정영역의 500 bps 특정부위의 cDNA를 사용하였다. Filter를 washing후 -80°C에서 X-ray 필름에 노출시킨 후

감광하였다.

결 과

1. Western blot analysis

BT, BX, A-BT, M-BT와 M-BX 및 D-BX 를 5일간 1mmol/kg 용량으로 경구투여한 후 랫드 간의 cytosol을 분리하여 이들 약물의 유도효과가 GSTs의 subunit인 Ya, Yb₁, Yb₂와 Yc에서 각각 어떠한 형태로 나타나는지를 알아보려고 rabbit anti-GST Ya, Yb₁, Yb₂와 Yc 항체를 사용하여 western immunoblot을 실시하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 GST subunit Ya의 유도는 BT와 그의 유도체에 의하여 대조군의 1.3~1.6배 정도로 증가되었으며, BX와 BX의 유도체인 M-BX, D-BX의 경우 각각 대조군의 1.6, 2.7, 1.5배로 band

의 강도가 증가되었다. 또 다른 GSTs의 α class에 속하는 Yc에 대한 유도효과를 살펴보면, BX와 BT 및 이들의 유도체 모두가 1.7~2.2배의 높은 유도 증가를 보였다. GSTs의 μ class인 subunit Yb₁은 모든 화합물들에 의해 1.2~2.9배의 유도증가가 있었으며 BT와 M-BX의 유도증가가 가장 크게 나타났다. μ class의 또 다른 subunit Yb₂의 유도발현은 BT, BX, A-BT에서만 각각 대조군에 비해 80, 40, 10%의 증가가 있었으며, 그의 화합물들은 대조군과 비교하여 변화가 거의 없었다.

2. Northern blot analysis

mRNA 상에서 GSTs의 유도 양상을 측정하기 위하여 상기 면역화학적 분석에서와 같이 BT, BX와 이들의 유도체들을 랫드에 처리한 후 간 조직으로부터 poly(A)⁺ mRNA를 추출하여 GSTs mRNA

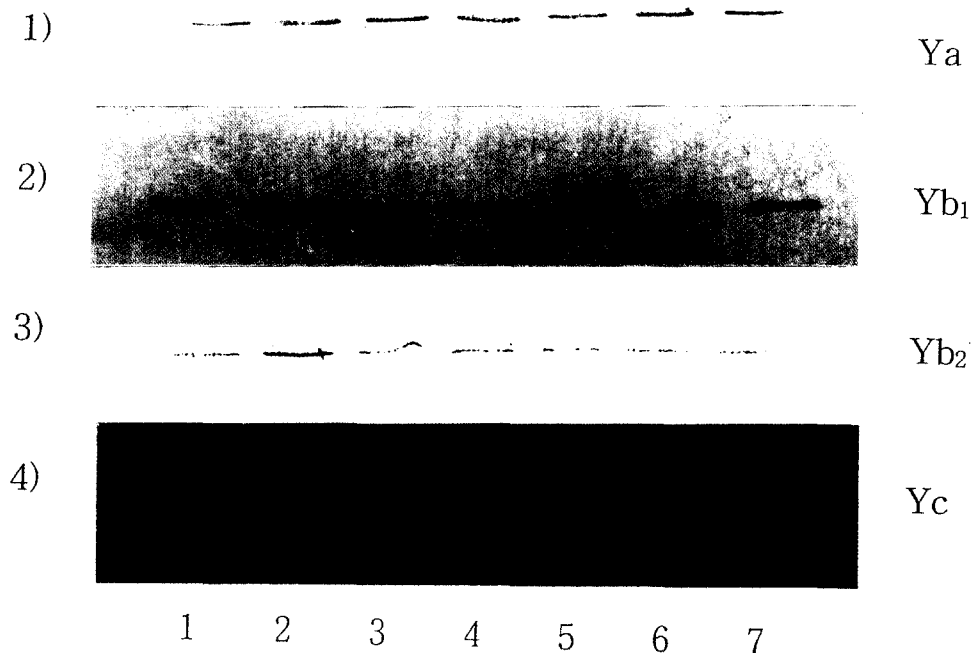


Fig. 2. Western blot analysis of rat hepatic cytosol.

Western blot analysis of hepatic cytosol with rabbit anti-rat class α GST antibodies: 1) anti-rat GST Ya antibody, 2) anti-rat GST Yb₁ antibody, 3) anti-rat GST Yb₂ antibody, 4) anti-rat GST Yc antibody. These blots exhibited GSTs level in hepatic cytosol isolated from rats untreated (lane 1), and treated with BT (lane 2), BX (lane 3), A-BT (lane 4), M-BT (lane 5), M-BX (lane 6) and D-BX (lane 7).

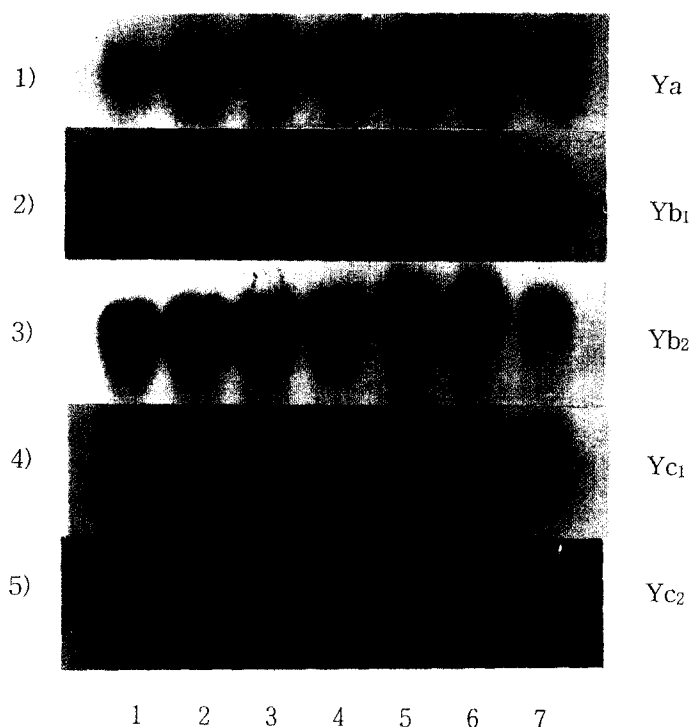


Fig. 3. Northern blot analysis of GST mRNA in rats treated with BAs.

Northern blot analysis of poly(A)⁺mRNA with cDNA probes. 1) Ya cDNA, 2) Yb1 cDNA, 3) Yb2 cDNA, 4) Yc1 cDNA, 5) Yc2 cDNA. These blots exhibited GSTs mRNA level hepatic tissue isolated from rats untreated (lane 1), and treated with BT (lane 2), BX (lane 3), A-BT (lane 4), M-BT (lane 5), M-BX (lane 6) and D-BX (lane 7).

를 정량하였다. GST subunit인 Ya, Yb₁, Yb₂, Yc₁, Yc₂ 각 유전자의 coding region 중 특이적인 염기서열 약 500 bp 정도의 특정부위 cDNA를 probe로 하여 poly(A)⁺ mRNA와 hybridization을 시켰다. 그 결과, Fig. 3에서 보는 바와 같이 GST subunit Ya의 경우, BT, BX와 모든 유도체들이 1.2~1.8배 정도로 그 유도를 증가시켰으며, BT, BX, M-BX 순으로 높은 증가를 나타내었다. Subunit Ya와 같은 α class에 속하는 Yc₁의 경우 D-BX를 제외한 모든 시험물질에 의하여 1.2~1.8배 가량 증가되었으며, D-BX의 처리에 의해서는 오히려 대조군의 77%로 낮아졌다. Yc₂의 경우도 Yc₁의 유도현상과 유사한 경향을 보여 D-BX를 제외한 모든 화합물이 대조군의 1.1~1.6배로 유도를 증가시켰으며, D-BX 처리군은 대조군과 차이를 보이지 않았다. GST isozymes 중 μ class에 대한 결과를 살펴보면, Yb₁의 경우 BT만

이 대조군의 2배 이상으로 유도를 크게 증가시켰으며 그외 다른 화합물에서는 대조군에 비하여 8~35%의 증가만을 나타내었고, D-BX의 경우는 대조군의 89% 정도의 band를 보였다. Yb₂에 대하여는 BT와 BX만이 각각 18, 13%의 유도증가를 나타냈을 뿐 그외 화합물들은 뚜렷한 유도증가를 나타내지 않았으며, M-BX와 D-BX의 경우에는 유도가 억제되었다.

고 찰

BT, BX, benzothiadiazole과 같이 질소, 황 또는 산소를 함유한 이환형구조가 benzene에 fusion되어 있는 형태의 BA계 화합물은 여러 종류의 식품에 포함되어 있을 뿐만 아니라 담배잎과 담배연기 속에도 함유되어 있다. 담배와 담배 연기속에 존재하는 것으로 현재까지 확인된 질소함유화합물은 약

600여종이 넘고, 이들 화합물중 일부는 cytochrome P-450의 유도증가 및 DNA strand의 손상과도 관련이 있는 것으로 보고되었다.¹⁸⁾

BA계 화합물 중 BT와 BX는 monoamine oxidase 억제작용을 가지고 있어 catecholamine의 효과를 강화하는 것으로 보고되었다.¹⁹⁾ 또한 BT를 모핵으로 하는 화합물인 A-BT는 아조염료합성에, M-BT는 고무경화가속제로 사용되고 사용빈도는 떨어지나 dithiazanine iodide는 감광유약으로 사용되고 있으며 BX유도체인 chlorzoxazone은 근육이완제로 쓰인다. Azole계 화합물의 구조적 변화에 따른 대사효소와 관련된 많은 연구결과가 보고되었는데, microsomal epoxide hydrolase (mEH) 유도발현에 있어 단백질수준 뿐만 아니라 mRNA 수준에서도 치환된 원자의 크기에 비례한다는 보고가 있다.¹⁹⁾ 보고에 의하면, azole계 화합물에 의하여 mEH 단백질과 mEH mRNA 농도가 함께 유도증가하며, 원자무게와 azole에 의해 증가된 mRNA 사이에 상관계수가 0.98로 그 상관성이 뚜렷하였고 mEH 유도와 azole에 의한 mEH mRNA의 상승은 azole환에서 치환된 원자의 크기가 클수록 mEH 유도정도가 커진다고 하였다.²⁰⁾ 그러나 또 다른 연구에서는 1-benzimidazole이 N-1-imidazole 치환체임에도 불구하고 mEH 단백질의 양적 증가없이 오직 효소활성화에 의해 mEH 활성도가 증가한다고 보고하였다.²¹⁾

본 실험에서는 BT와 BX 및 이들의 유도체를 투여하여 모핵과 유도체의 구조적 변화, 즉 치환기의 종류와 수, 그리고 위치에 따라 이들 약물이 GSTs 대사효소 발현에 어떤 영향을 미치는가를 단백질 수준과 mRNA 농도를 통하여 살펴보았다. Western immunoblot과 northern blot 분석결과를 보면, GSTs의 모든 subunit에 대하여 BT 투여군의 유도효과가 가장 강하였으며, BT에 비해 BT의 유도체인 A-BT, M-BT 투여군은 대조군에 비해서는 유도증가를 보였으나 BT 보다는 강하지 못하였다. BX의 경우도 그 유도체들이 모핵보다 유도효과가 저하되었는데, methyl기가 benzene 환에 붙었을 때 GSTs subunit의 단백질량과 mRNA양 모두가 더 감소하였다. 이러한 결과로부터 GSTs의 유도는 화학물질의 구조와 관련된 상관성이 있음을 알 수 있으며, 본 실험에서는 BT와 BX에 치환기를 추가하여도 그 유도효과가 증가되지는 않을 것으로 판단

되었다.

GST의 class α 와 μ 에 대한 BA계 화합물의 유도효과를 보면 BA계 화합물은 GST의 α class에 대하여 유도효과가 크게 나타나며, μ class에 대해서는 비교적 유도효과가 뚜렷하지 않은 것으로 생각되었다. α class의 Ya와 Yc subunit는 모든 화합물에 대하여 유도가 잘 되었으나 μ class의 Yb₁과 Yb₂는 BT를 제외하고는 현저한 유도증가가 관찰되지 않았다. GSTs 효소에 대한 western immunoblot 결과와 northern blot 결과를 비교하여 보면 GST 단백질량이 증가한 대부분의 경우 mRNA의 농도도 증가하여 시험물질에 의한 GST의 유도현상은 mRNA 수준에서 일어나는 것으로 생각되었다.

본 연구결과를 요약하면, 본 실험에서 사용한 BA계 화합물인 BT, BX, A-BT, M-BT, M-BX와 D-BX 모두가 GSTs 유도작용을 나타냈으며 이중 BT가 가장 높은 유도효과를 보였다. BT의 유도체인 A-BT와 M-BT는 대조군에 비해서는 유도증가는 보였으나 모핵보다는 유도효과가 감소되는 것으로 나타났으며, BX의 경우도 그 유도체들이 모핵보다 유도효과가 저하되었는데 methyl기가 benzene 환에 붙는 경우 유도효과 감소가 더 크게 나타나 GST의 유도는 화합물의 구조와 뚜렷한 상관관계가 있는 것으로 생각되었다. 또한 GST의 class α 가 class μ 보다 화합물에 의한 유도가 더 뚜렷하게 나타났으며, 단백질의 증감과 mRNA의 농도 변화와는 일치하는 경향을 보여 시험물질에 의한 GST의 유도현상은 mRNA 수준에서 일어나는 현상임을 추정할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Geoffrey, J.B. and John, O.H. : Glutathione-S-transferases: Biomedical applications. *Advances in Clinical Chemistry* **30**, 281-380, 1994.
2. Pickett, C.B., Telalowski-Hopkins, C.A., Ding, G.J.-F., Argenbright, L. and Lu, A.Y.H. : Rat liver glutathione-S-transferases. *J. Biol. Chem.* **259**(8), 5182-5188, 1984.
3. Harris, J.M., Meyer, D.J., Coles, B. and Ketterer, B. : A novel glutathione transferase (13-13) isolated from the matrix of rat liver mitochondria having structural similarity to class Theta enzymes. *Biochem. J.* **278**, 137-

- 141, 1991.
4. Hiratsuka, A., Sebata, N., Kawashima, K., Okuda, H., Ogura, K., Watabe, T., Satoh, K., Hatayama, I., Tsuchida, S., Ishikawa, T. and Sato, K. : A new class of rat glutathione-S-transferase Yrs-Yrs inactivating reactive sulfate esters as metabolites of carcinogenic arylmethanols. *J. Biol. Chem.* **265**, 11973-11981, 1990.
 5. Hales, B.F. and Niems, A.H. : Induction of rat hepatic glutathione-S-transferase B by phenobarbital and 3-methylcholanthrene. *Biochem. Pharmacol.* **26**, 555-556, 1977.
 6. Igarashi T., Irokawa, N., Ono, S., Ohmori, S., Ueno, K., Kitagawa, H. and Satoh, T. : Difference in the effects of phenobarbital and 3-methylcholanthrene treatment on subunit composition of hepatic glutathione-S-transferase in male and female rats. *Xenobiotica* **17**, 127-137, 1987.
 7. Rushmore, T.H. and Pickett, C.B. : Transcriptional regulation of the rat Ya subunit gene: Characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants. *J. Biol. Chem.* **265**(14), 648-653, 1990.
 8. Schmeltz, I. and Hoffmann, D. : Nitrogen-containing compounds in tobacco and tobacco smokes. *Chem. Rev.* **77**, 295-312, 1977.
 9. Vitzthum, O.G. and Werkhoff, P. : Oxazoles and thiazoles in coffee aroma. *J. Food Sci.* **39**, 1210-1215, 1974.
 10. 양원경 : Azole 및 benzene-fused azole계 화합물에 의한 대사효소 발현; 내인성 방어물질과 효소발현의 상관성. 덕성여자대학교 약학대학 박사학위논문, 1995.
 11. Lowry, Lowry, OH, NJ Rosbrough, AL Farr, and RJ Randall. *Anal. J. Biol. Chem.* **193**, 265, 1951.
 12. Laemmli, U.K. : Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685, 1970.
 13. Davis, I.G., Dibner, M.D. and Battery, J.F. : *Basic methods in molecular biology*. New York : Elsevier, 311-314, 1986.
 14. Cathala, G.J.F., Savouret, B., Mendez, B.L., West, M.K., Martial, J.A. and Baxter, J.D. : Laboratory methods: A method for isolation of intact, translationally active ribonucleic acids. *DNA* **2**, 329-335, 1988.
 15. Chomezynski, P. and Sacchi, N. : Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159, 1987.
 16. Puissant, C. and Houdebine, L.M. : An improvement of the single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Biotechniques* **8**, 148-149, 1990.
 17. Jacobson, A. : Purification and fractionation of poly(A)⁺ RNA. *Methods Enzymol.* **152**, 254-261, 1987.
 18. Kim, S.G. and Novak, R.F. : Role of P450 II E1 in the metabolism of 3-hydroxypyridine, a constituent of tobacco smoke; redox cycling and DNA strand scission by the metabolite 2,5-dihydroxypyridine. *Cancer Res.* **50**, 5333-5339, 1990.
 19. Arthur, G.B., Peter, B.G. and Marilyn, J.S. : Benzo-2,1,5-oxadiazoles a novel class of heterocyclic monoamine oxidase inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* **23**, 1963-1968, 1974.
 20. Kim, S.G., Jung, K.H., Yang, W.K. and Kim, N.D. : Differential expression of microsomal epoxide hydrolase gene by azole heterocycles in rats. *Biochem. Pharmacol.* **48**, 111-120, 1994.
 21. Magdalou, J., Totis, M., Boiteux-Antoine A. F., Fournel-Gigleux, S. and Siest, G. : Effect of 1-benzimidazole on cytochrome P-450 induction and on the activities of epoxide hydrolase and UDP-glucuronyl transferases in rat liver. *Biochem. Pharmacol.* **37**, 3297-3304, 1988.