

Xanthine oxidase 활성 및 형전환에 미치는 구리이온의 영향

허 근# · 이상일* · 박진우**

#영남대학교 약학대학 약리학교실, *계명전문대학 식품영양학과, **경북대학교 자연과학대학 생화학과

(Received January 28, 1994)

Effect of Copper Ion on Xanthine Oxidase Activity and Type Conversion

Keun Huh#, Sang-il Lee* and Jeen-woo Park**

*Dept. of Pharmacology, College of Pharmacy, Yeung-nam Univ.

**Dept. of Food & Nutrition, Kei-myung Junior College.

**Dept. of Biochemistry, College of Natural Science, Keyng-pook National Univ.

Abstract—Copper intoxication and disturbance of copper metabolism induced various oxygen-derived free radicals related damages. The effect of copper ion on xanthine oxidase activity and type conversion of the enzyme which is concerned to generation of reactive oxygen species, was investigated. It was observed that xanthine oxidase activity was increased by addition of copper ion in the reaction mixture in proportional to the concentration of the metal ion until 60 μ M, while the enzyme activity was inhibited in higher concentration of copper treatment. On the other hand, xanthine dehydrogenase activity was inhibited by copper ion addition with concentration dependently. Preincubation of enzyme source with 30 μ M of copper ion, which concentration marked increased the xanthine oxidase activity, unchanged the enzyme activity and type conversion compare to control *in vitro* system. It was also observed that copper induced xanthine oxidase activity and the enzyme type conversion was protected by dithiothreitol and penicillamine. These results indicate that the increment of the type conversion of xanthine oxidase necessarily need the presence of copper ion in enzyme assay system.

Keywords □ Copper ion, xanthine oxidase activity, type conversion.

구리는 자연계에 널리 분포되어있는 생체 필수 미량 원소로 멜라닌 색소의 형성과정, tyrosine hydroxylase, cytochrome oxidase, superoxide dismutase, amine oxidase, uricase 와 ceruloplasmin 형성과정에 필수적인 물질이다.¹⁻⁵⁾ 그러나 과잉의 구리가 함유된 물질을 섭취하던가 구리의 생화학적 대사 이상으로 혈중이나 다른 조직에 구리 이온이 축적될때 Wilson's 증후군을 일으키게 된다.⁶⁾ 구리 중독 현상의 하나로 간 기능장애가 유도되어 진다는 보고가 있으나 구리 중독의 발현 기전에 대해서는 아직 미지의 분야가 많이 남아있다.⁷⁾

구리이온은 철이온과 더불어 oxidative stress 발 현과정에서 야기되는 과산화지질 생성을 항진시키며⁸⁾ 또한 superoxide anion radical, H₂O₂, 그리고 가장 반응성이 강한 활성 산소로 알려진·OH radical 생성을 증가시킨다는⁹⁾ 사실이 보고되고 있으나 아직 정확한 기전은 밝혀지지 않고 있다. 활성산소 생성은 생체내에서 대부분의 경우 산화효소가 분자산소를 이용하여 기질을 산화시키는 반응이 진행될 때 이루어진다.¹⁰⁾ 특히 xanthine oxidase는 활성산소 생성기구에 이용되어지는 대표적인 산화효소이므로¹¹⁻¹⁴⁾ 구리이온이 xanthine oxidase활성에 어떤 영향을 주는가를 관찰하여 구리이온이 관여하는 활성산소 독성 기전을 추구하고자 하였다.

#본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

실험 재료 및 방법

실험 재료—Copper sulfate, dithiothreitol, penicillamine, xanthine sodium salt, NAD⁺는 Sigma사 제품을 구입하여 사용하였으며, 기타 이 실험에 이용한 모든 시약은 특급시약을 시중에서 구입하여 사용하였다.

실험 동물—Sprague-Dawley계 흰쥐를 구입하여 영남대학교 약학대학 동물사에서 일정한 조건으로 사육한 체중 200 g정도의 웅성 흰쥐를 실험에 사용하였다.

Xanthine dehydrogenase(xanthine 산화효소 type D) 활성실험—Stirpe 등의 방법¹⁵⁾에 준해 전자수용체인 NAD⁺(330 μM) 또는 MB(20 μM)와 기질인 xanthine(60 μM) 이 함유된 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5)에 효소원을 첨가하여 호기상태로 30 °C에서 반응시켜 생성되는 uric acid를 파장 292 nm에서 흡광도를 측정하여 활성도를 산정하였다.

Xanthine oxidase(xanthine 산화효소 type O) 활성실험—Stirpe 등의 방법¹⁵⁾에 준해 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5)에 xanthine과 효소원을 가하여 기질의 전자수용체로 공기중의 분자상의 산소가 존재하는 상태에서 30°C로 반응시켰으며 이때 생성되는 uric acid를 파장 292 nm에서 흡광도를 측정하여 활성도를 산정하였다.

Xanthine 산화효소 형전환 실험—xanthine dehydrogenase(type D)에서 xanthine oxidase(type O)로의 형전환 속도를 O/D+O의 비로 산출하였다.

단백질 함량 측정—Lowry 등의 방법¹⁶⁾에 의해 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 측정하였다. 한편 실험결과의 통계처리는 student's t-test를 이용하여 계산하였다.

결과 및 고찰

Xanthine oxidase 활성에 미치는 구리이온의 영향—Xanthine oxidase는 기질을 산화하는 반응을 촉매하는 과정에 NAD⁺를 전자수용체로 이용하는 경우를 xanthine dehydrogenase(type D), 산소를 전자수용체로 하여 기질을 산화시키는 반응을 촉매하는 상태를 xanthine oxidase(type O)로 나눌 수 있으며 이들 두 형태의 활성을 합한 것을 Total activity라고 편의상

Table I—Effect of Cu⁺² on the hepatic xanthine oxidase activity *in vitro*

Concentration of copper (μM)	Specific activity*(electron acceptor: MB)			
	30°C		37°C	
	O	D+O	O	D+O
0	0.275	2.723	0.377	2.936
5	0.695	2.685	1.421	3.160
10	0.995	3.051	2.296	3.124
20	2.481	3.146	3.388	3.388
30	2.804	3.140	3.379	3.379
40	2.799	3.352	3.926	3.926
50	2.828	3.290	3.993	3.993
60	2.870	3.170	3.823	3.823
70	2.679	2.883	3.760	3.760
80	2.613	2.667	3.504	3.504
100	2.355	2.379	3.245	3.245
120	1.954	2.301	2.765	2.765
150	1.522	1.762	2.227	2.227
200	1.031	1.283	1.537	1.537
250	0.731	0.917	1.152	1.152
300	0.425	0.653	0.937	0.937
400	0.270	0.438	0.659	0.659
500	0.126	0.324	0.450	0.450

Concentration of copper (μM)	Specific activity*(electron acceptor: NAD)			
	30°C		37°C	
	O	D+O	O	D+O
0	0.267	2.638	0.370	2.920
5	0.596	2.594	1.319	2.943
10	1.021	2.739	2.008	2.840
20	2.498	2.961	2.891	2.983
30	2.879	3.038	2.862	2.862
40	3.000	3.171	3.029	3.029
50	3.056	3.164	3.167	3.167
60	2.987	3.202	3.287	3.287
70	3.018	3.088	3.310	3.310
80	2.917	2.917	3.189	3.189
100	2.651	2.651	2.869	2.869
120	2.486	2.486	2.615	2.615
150	1.870	1.870	2.318	2.318
200	1.427	1.422	1.548	1.548
250	1.028	1.028	1.359	1.359
300	0.806	0.806	0.964	0.964
400	0.577	0.577	0.631	0.631
500	0.361	0.361	0.321	0.321

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are means for 3 separate experiments. #: Uric acid nmoles/mg protein/min.

*NAD: Nicotinamide adenine dinucleotide, MB: Methylene blue used as electron acceptor respectively

구분하여 설명한다.¹⁷⁾ 2가 구리이온을 반응액 중에 첨가하면서 xanthine oxidase의 활성에 어떤 영향을 주는가를 관찰한 실험성적을 Table I에 나타내었다. 2가 구리이온의 첨가농도에 비례하여 type O의 활성은 점차적으로 증가하였으며 첨가 농도가 5 μM 에서 1.5배, 10 μM 일때는 약 3배, 20 μM 이상에서는 xanthine oxidase의 대부분이 type O 활성만을 나타내는 현상이 60~70 μM 까지 계속되다가 80 μM 이상의 구리이온 첨가에서는 농도에 반비례하여 급격하게 효소활성이 억제되는 상반되는 작용이 관찰되었다. 이와 같은 구리이온의 2중 작용에 대해 현단계로서는 충분하게 설명할 수 없으나 아마도 높은 농도의 구리이온이 반응액중에 존재할때는 xanthine oxidase 활성발현과정에 관여하는 모든 sulfhydryl 기의 기능을 봉쇄해버리는 작용때문에 나타나는 현상이 아닐까 예상되나 이 문제에 대해서는 계속적인 연구가 필요하다고 생각되어진다.

Xanthine oxidase활성에 대한 구리 이온의 영향을 관찰하는 과정에서 기질의 전자를 NAD^+ 에 전달하여 산화반응을 진행시키는 실험 반응 조건과, 기질의 전자수용체로서 methylene blue를 활용하는 실험 반응 조건을 이용하여 검토하였을 때 두 실험 조건에서 유사한 경향의 실험 성적을 나타내고 있었으며 대체적으로 모든 조건에서 methylene blue를 전자수용체로 활용하였을 때의 xanthine oxidase활성이 NAD^+ 의 경우보다 약간 높게 나타나고 있음이 관찰되었는데 (Fig. 1) 이 현상에 대해서는 정확하게 설명할 수 없으나 산화반응이 이루어지는 과정에 참여할때 나타나는 물리화학적 성질의 차이일 것으로 생각되어진다.

구리 이온 첨가 농도에 비례하여 type O의 활성은 점차 증가하는 경향을 보이는 데, 이와 같은 type O와는 반대로 type D의 경우에는 구리 첨가농도에 반비례하여 그 활성이 점차 억제되어 20 μM 의 농도에서는 거의 활성이 나타나지 않았다. 이와 같은 현상은 구리이온이 xanthine dehydrogenase로 부터 xanthine oxidase로 전환시키는 과정에 관여하고 있음을 시사하고 있는 것으로 생각되어진다. Xanthine oxidase의 type D는 생체내에서 병리 조건이 부여되던가, 미세혈관 순환장애나 oxidative stress가 원인이 되는 병태생리 조건이 형성되는 과정에서 type O로의 전환이 이루어진다¹⁸⁾ 사실을 고려하면 매우 흥미

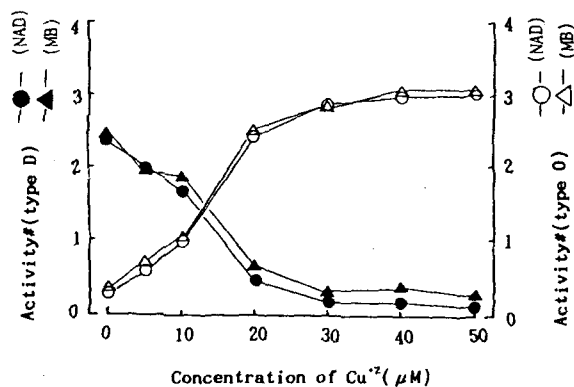


Fig. 1—Effect of Cu^{+2} on the hepatic xanthine dehydrogenase(type D) and xanthine oxidase(type O) activities *in vitro*.

The final concentration of copper ion in incubation mixture were 0~50 μM . The assay procedure was described in the experimental methods. Cofactor was used NAD^+ or MB(methylene blue). Values are means for 3 separate experiments. #: Uric acid nmoles/mg protein/min.

있는 실험 성적이라 생각되며 또한 구리이온의 xanthine oxidase형전환 촉진 작용에 대해 관심 있는 연구 수행계획을 유도케 한 실험성적이라고도 생각되어진다.

가온 처리에 따른 Xanthine oxidase형전환 변화—

Xanthine oxidase는 효소원을 냉동 용해 과정처리를 하던가 37 $^{\circ}\text{C}$ 로 가온 처리하였을 경우에도 type D로부터 type O로의 형전환이 이루어진다.¹⁹⁾ 앞에서 언급 한 것처럼 구리이온이 xanthine oxidase형전환에 영향을 줄 것으로 예상되기 때문에 이와 같은 현상을 설명할 수 있는 실험 자료를 얻을 목적으로 Fig. 2와 같은 실험을 행하였다.

Fig. 2에서 볼 수 있는 것처럼 효소원을 20~30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 가온 처리하였을 때는 xanthine oxidase형전환에 큰 영향을 주지 않았으나 35 $^{\circ}\text{C}$ 이상의 온도에서 부터 형전환율이 급격히 증가되어 40 $^{\circ}\text{C}$ 부근에서는 약 2배 정도의 형전환이 이루어지고 있었으며 가온 온도에 비례하여 점차 xanthine oxidase형전환율이 증가하여 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서는 거의 완전하게 형전환이 이루어져 type D의 활성은 나타나지 않았다. 이와 같은 실험성적은 xanthine oxidase가 체온인 37 $^{\circ}\text{C}$ 로 가온처리할 때에는 상당한 부분의 type D가 type O

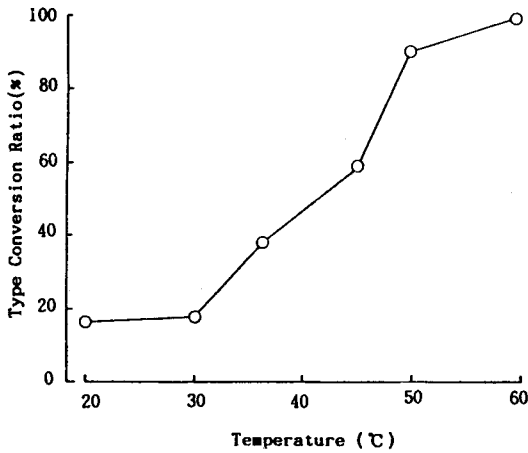


Fig. 2—Effect of various temperature on the hepatic xanthine oxidase type conversion *in vitro*. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are means for 3 separate experiments.

로의 전환이 이루어지고 있음을 시사하고 있다. 그러므로 온도에 의한 xanthine oxidase의 형전환 현상을 배제하는 실험조건을 갖추기 위하여 모든 실험 조작은 30°C 이하에서 시행하였다.

구리이온의 전처리가 xanthine oxidase형전환에 미치는 영향—구리이온의 첨가에 의한 xanthine oxidase 형전환을 증가현상이 효소단백에 직접 구리이온이 작용하므로써 나타나는지를 검토할 목적으로 효소원을 30°C 에서 여러 농도의 구리이온과 10분간 가온 처리하고 이것을 반응액 중에 첨가하여 기질의 산화반응정도를 관찰하면서 xanthine oxidase형전환율의 변화를 관찰한 실험성적이 Fig. 3이다.

앞에서의 실험 성적들이 구리이온 존재하에서 xanthine oxidase의 형전환현상으로 인해 type D의 활성은 감소되고 type O의 활성은 증가하는 실험 결과일 것임을 강력히 시사하고 있가 때문에, 구리이온의 여러가지 농도별로 효소원과 같이 30°C 에서 10분간 가온 처리한 다음 이것을 반응액 중에 첨가하여 효소활성을 측정하였을 때 농도의존적으로 xanthine oxidase형전환률이 증가되어지고 있음을 관찰할 수 있었다. 가온 전처리 과정에서의 구리이온 농도를 30 μM되게 하고 10분간 preincubation한 것을 효소원으로 하여 xanthine oxidase형전환률을 측정하였을

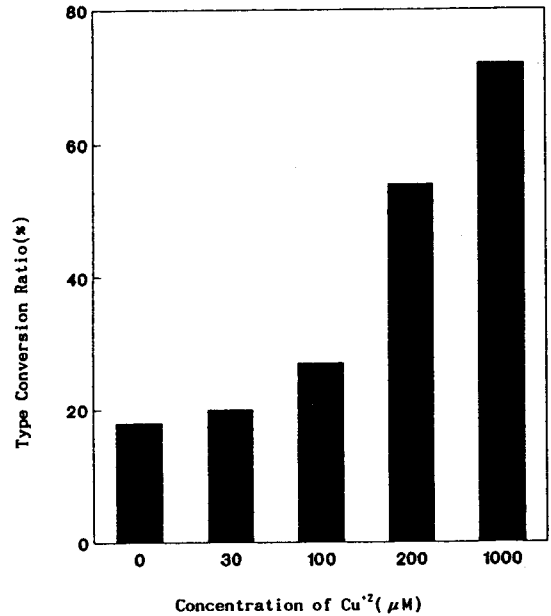


Fig. 3—Effect of preincubation of enzyme source with Cu²⁺ on the xanthine oxidase type conversion *in vitro*.

The final concentration of copper ion in preincubation enzyme solution were 0~1000 μM. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are means for 3 separate experiments.

때는 대조군과 유사한 정도였으나, 구리 이온 농도가 100, 200 및 1000 μM이 되게하고 preincubation한 경우는 대조군에 비해 각각 1.5배, 3.0배 및 4.0배의 형전환률 증가 효과가 관찰되었다. 이와 같은 구리 이온 농도는 효소활성 측정시 반응액 중에서는 희석되어지며 preincubation시의 구리이온 200 μM은 반응액 중에서는 약 25 μM정도가 된다. 이와 같은 점을 고려하면 반응액중의 구리이온 농도가 30 μM정도에서 xanthine oxidase의 활성을 현저하게 증가시키는 실험결과(Fig. 1)는 이 효소의 형전환에 의해 나타나는 현상으로 설명할 수 있으며 이와 같은 형전환은 구리이온이 효소원 및 기질과 공존하는 실험 조건에서 라야만 이루어 진다는 사실이 본 실험을 통하여 증명되었다고 본다. 구리이온에 의한 xanthine oxidase형전환 기전은 확실하게 설명 할 수 없으나 구리이온이 효소활성 부위의 SH기를 산화시킨다는 연

구보고와²⁰⁾ 연관시켜 검토할 때 구리이온은 우선적으로 xanthine oxidase의 type D의 SH기를 변성시키는 선택작용이 있어 type O의 활성만이 나타나는 현상이 아닐까하고 추측되어지나 이 문제에 대해서는 계속적인 연구를 수행중에 있다.

구리이온이 유도한 xanthine oxidase형전환에 미치는 penicillamine과 dithiothreitol의 영향~ 구리이온은 xanthine oxidase형전환을 증가시키고 있음을 확인하고 그 기전을 추구할 목적으로 효소의 sulfhydryl (SH) group을 보호하는 dithiothreitol(DTT)과, SH기를 갖고 있으며 또한 구리를 비롯하여 여러가지 금속들과 친화력을 갖는 penicillamine이 공존하는 실험 조건에서 구리이온이 유도하는 xanthine oxidase형전환 현상이 어떻게 변화되는가를 관찰하여 Fig. 4에 나타내었다.

반응액중에 구리이온 농도가 30 μM 일 경우 xanthine oxidase형전환률은 약 80%이던 것이 10 mM의 DTT첨가에서는 38%정도로 형전환률이 억제되었으며 반응액중에 penicillamine 10 mM이 되는 실험 조건에서는 30%의 형전환을 나타내어 DTT와 penicillamine 모두가 구리이온에 의해서 촉진되는 xanthine oxidase형전환을 현저하게 억제시키고 있음을 알 수 있었다. Penicillamine과 DTT의 형전환 억제작용을 비교하였을 때 DTT보다 penicillamine이 구리이온이 유도하는 xanthine oxidase형전환을 더 강력하게 억제하고 있음이 관찰되었는데 이와 같은 현상은 penicillamine이 구리이온과 chelating하는 성질뿐만 아니라 분자 중에 SH기를 갖고 있어 SH의 산화를 경쟁적으로 억제하여 효소중의 SH기를 보호하기 때문일 것으로 생각 되어진다. 이와 같은 결과는 최근 구리와 결합한 단백질로 생체내에서 철, 구리 및 아연 등의 대사에 관여하고 있으며 free radical scavenger의 역할을 수행하고 있는 것으로 알려지고 있는 ceruloplasmin의 SH group이 노화과정과 같은 병태 생리 조건에 의해서 변화된다는 연구 보고와²¹⁾ 연관지어 볼때 매우 흥미있는 실험결과라고 생각되어진다. Xanthine oxidase형전환 과정에서 효소중 SH기의 산화가 중요한 인자가 될 것이라고 생각되어지고 있는 점과²⁰⁾ 연결시켜 검토하면 구리이온에 의한 xanthine oxidase형전환 기전 설명이 어느정도 가능할 것으로 생각되어 지나 보다 많은 연구가 뒤따라야 될 것으로 사료된다.

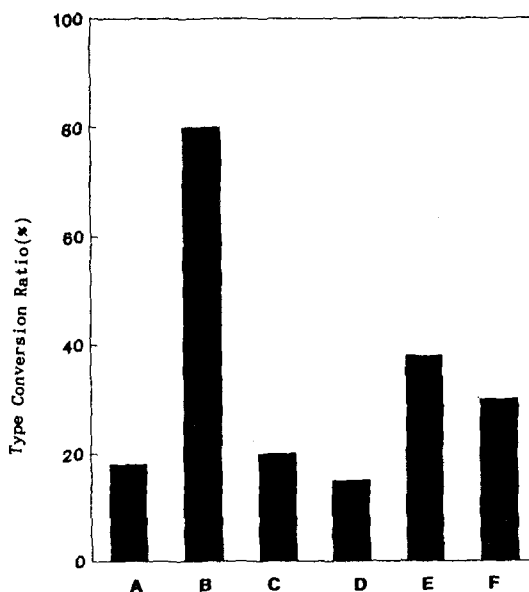


Fig. 4—Effect of dithiothreitol or penicillamine on the Cu^{+2} -induced type conversion of xanthine oxidase *in vitro*.

The final concentration of copper ion in incubation mixture was 30 μM . The assay procedure was described in the experimental methods. Values are means for 3 separate experiments. A: control, B: Cu^{+2} (30 μM), C: DTT(10 mM), D: Penicillamine(10 mM), E: Cu^{+2} (30 μM)+DTT, F: Cu^{+2} (30 μM)+Penicillamine.

이상의 실험 성적을 종합적으로 검토하여 볼때 구리이온에 의해서 야기되는 독성발현과정에는 xanthine oxidase의 형전환이 관련되는 oxidative stress (산화적 손상)과 상관성이 있을 것으로 생각할 수 있다. 구리이온은 인지질이나 지방산의 과산화반응을 촉진시키며⁸⁾ 세레늄이나 vitamin C와 같은 항산화인자의 결핍상태에서는 보다 많은 과산화지질의 생성증가현상이 나타난다는 연구보고가 있다.²²⁾ 뿐만 아니라 구리이온은 hydralazine이 야기시키는 DNA 손상을 증강시키고 돌연변이원성 및 발암성 효과도 증강시키며⁷⁾ 이와 같은 현상은 free radical과 연관지어 설명할 수 있을 것이라고 하였으나 구리의 독성증강 작용 기전은 충분히 설명되지 못하고 있는 실정이다.

구리이온의 독성 증상으로 간중심 정맥 주변의 병변이나 황달과 같은 간조직 손상과 기능장애가 나타나며²³⁾ 구리이온의 대사이상으로 인해 유도되어지는

Wilson씨 질환들도 구리이온이 간, 뇌 및 신장 등의 조직에 과잉으로 축적되어지는 병태생리 현상에 의해 초래되어진다는 점을 고려하면²⁴⁾ 구리이온이 xanthine oxidase의 형전환을 촉진시키므로서 이 현상과 병행하여 활성산소가 보다 많이 생성되는 조건을 충족시킬 것이라는 본 연구 실험 성적들은, 구리이온의 독성 발현 기전을 구명하는데 부분적이거나 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

결론

구리이온 독성을 free radical 생성과정에 중요한 역할을 수행하는 xanthine oxidase와 연관시켜 검토하였다. 반응액 중에 구리이온을 소량 첨가하였을 때에는 점차적으로 본 효소의 활성이 증가하였으며 60 μM 이상의 농도에서는 첨가농도에 반비례하여 효소활성이 감소하였다. Xanthine oxidase의 형전환 과정에서 구리이온은 형전환을 촉진시키는 역할은 하였으며 30 μM 정도에서 최대의 효과를 나타내었다. 구리이온에 의해서 야기되는 형전환 촉진효과는 구리이온이 효소의 구조변화를 유도하기때문이 아니고 구리이온이 반응계에 직접 참여하여 나타내는 작용일 것으로 예상된다.

감사의 말씀

이 연구는 한국과학재단 연구비 지원(과제번호: 91-07-00-13)에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) Undwood, T. J.: Trace elements in human and animal nutrition. pp. 281. Academic Press, New York & London (1971).
- 2) Everson, G. J., Tsai, M. C. and Wang, T.: Effect of copper on cytochrome oxidase activity. *J. Nutr.*, **93**: 533 (1964).
- 3) Manson, H. S.: Role of copper in melanin biosynthesis. *Adv. Enzymol.*, **19**: 79 (1957).
- 4) Brigelius, R., Spottl, R., Saran, M. and Weser, U.: SOD activity of low molecular weight Cu^{2+} -chelates. *FEBS Lett.*, **47**: 72 (1974).
- 5) Amdur, A. O., Doull, J. and Klaassen, C. D.: Casarett and Doull's Toxicology. (4th ed.) Pergamon Press, pp. 653 (1991).
- 6) Chan, W. Y., Tease, L. A., Liu, H. C. and Rennert, O. M.: Cell culture studies in Wilson's disease. In Sarkar, B.(ed.): Biological Aspects of Metals and Metal-Related Diseases. Raven Press, New York, pp. 147-158 (1983).
- 7) Yamamoto, K. and Kawanishi, S: Free radical production and site specific DNA damage induced by hydralazine in the presence of heavy metal ions. *Biochem. Pharmacol.*, **41**: 905 (1991).
- 8) Morita, M., Fujimaki, M.: The effect of copper and EDTA on the antioxidation of phospholipid emulsions. *Agr. Biol. Chem.*, **36**: 1163 (1972).
- 9) Lee, Y. S., Chung, M. H., Kim, Y. S. and Kim, M. S.: Evidence for OH radical involvement in Cu^{2+} -catalyzed peroxidation. *Environ. Mutagen. Carcino.*, **6**: 105 (1986).
- 10) Fong, K. L., Mckay, P. B., Poyer, J. L. and Misra, H.: Role of oxidative enzyme in superoxide anion production. *J. Biol. Chem.*, **248**: 7792 (1973).
- 11) Granger, D. N., McCord, J. M., Parks, D. A. and Hollowarth, M. E.: Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine. *Gastroenterol.*, **90**: 80-84 (1986).
- 12) Yokoyama, Y., Beckman, J. S., Beckman, T. K., Wheat, J. K., Cash, T. G. Freeman, B. A. and Parks, D. A.: Circulating xanthine oxidase: Potential mediator of ischemic injury. *Am. J. Physiol.*, **258**: G 564-G570 (1990).
- 13) Parks, D. A., Williams, T. K. and Beckman, J. S.: Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: A reevaluation. *Am. J. Physiol.*, **254**: G768-G774 (1988).
- 14) Tan, S., Yokoyama, Y., Cash, T. G., Freeman, B. A. and Parks, D. A.: Xanthine oxidase activity in the circulation of rats following hemorrhagic shock. *Free Radical Biol. Med.*, **152**: 407 (1993).
- 15) Stirpe, F. and Della Corte, E.: The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, **244**: 3855 (1969).
- 16) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and

- Randall, R. J.: Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265 (1951).
- 17) Wand, W. R. and Rajagopalan, K. V.: The mechanism of conversion of rat liver xanthine dehydrogenase from an NAD-dependent form(type D) to O₂-dependent form(type O). *Arch. Biochem. Biophys.*, **172**: 365 (1976).
- 18) Jarasch, E. D., Bruder, E. and Heid, H. W: Significance of xanthine oxidase in capillary endothelium cells. *Acta. Physiol. Scand. Suppl.*, **548**: 39 (1986).
- 19) Battelli, M. G.: Enzymic conversion of rat liver xanthine oxidase from dehydrogenase(D form) to oxidase(O form). *FEBS lett.*, **113**: 47 (1980).
- 20) Tatyankenko, L. V., Gvozeder, R. I., Lebedeva, O. I., Gorkin, V. Z. and Yakovlev, V. A.: Properties of SH groups oxidation of tyramine oxidase. *Biochem. Biophys. Acta.*, **242**: 23 (1971).
- 21) Musci, G., Patti, M. B., Fagiolo, U. and Calabrese, L.: Age-related changes in human ceruloplasmin evidence for oxidative modification. *J. Biol. Chem.*, **268**: 13388 (1993).
- 22) Dougherty, J. J. and Hoekstra, W. G.: Effect of vitamin E and selenium on copper-induced lipid peroxidation *in vivo* and on acute copper toxicity. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **169**: 201 (1982).
- 23) Chuttani, H. K., Gupti, P. S. and Gultani, S.: Acute copper sulfate poisoning. *Am. J. Med.*, **39**: 849 (1965).
- 24) Walshe, J. M.: Endogenous copper clearance in Wilson's disease: A study of the mode of action of penicillamine. *Clin. Sci.*, **26**: 461 (1964).