J. Korean Soc. Food Nutr.
23(4), 581 ~ 586(1994)

유기게르마늄(GE-132)이 Glutathione S-Transferase활성에 미치는 영향

김석환 · 박은숙 · 조태현* · 최종원*†
동아대학교 식품영양학과
*경성대학교 약학과

The Study of Pretreated GE-132 on the Hepatic Glutathione S-Transferase Activity in Rat

Seok-Hwan Kim, Eun-Sook Park, Tae-Hyun Jo* and Jong-Won Choi*†
Dept. of Food Science and Nutrition, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea
**Dept. of Pharmacy, Kyungsung University, Pusan 608-736, Korea*

Abstract

The study was initiated to elucidate the mechanism by examining the effect of GE-132 on hepatic glutathione S-transferase (GST) activity. Activity of GST increased with dose-dependent manner in hepatic cytosolic fraction of GE-132 treatment rats. Double reciprocal plotting gave Vmax value 1.4 fold increase by the treatment of GE-132 (100mg/kg, p.o. for 6 weeks) compared with control group, but did not change Km value. Ethacrynic acid (85mg/kg, once a day, i.p.) was injected to control rat, the GST activity decreased remarkably. However, GE-132 pretreated group, the effect caused by ethacrynic acid was markedly reduced. And activity of γ-glutamylcysteine synthetase was not changed either by GE-132 treatment, but the activity of glutathione reductase increased significantly. Decreasing properties of ethacrynic acid decreased level of hepatic glutathione, which was restored to same degree by GE-132 pretreatment. GE-132 also protective effect on ethacrynic acid-induced mortality. It is concluded that the effect of GE-132 is partly mediated by increase in hepatic GST activity.

Key words : GE-132, ethacrynic acid, glutathione level, glutathione reductase, glutathione S-transferase

서 론

GE-132 (carboxyethylgermanium sesquioxide)는 1967년에 합성되어 다년간 연구 결과 inteferon 생성에 기인한 *in vitro* 및 *in vivo* 실험에서 세포 독성이 없이 항종양효과에 의한 생명 연장을 보고한 바 있다[1,2]. 항종양효과 이외에도 *E. coli*의 DNA 합성과정의 적합도(fidelity)를 증진시키므로 γ-ray에 의해 유도된 돌연변이 활성을 현저히 감소시키며[3] natural killer 세포의 활성화와 macrophages, T-suppresser cell의 활성화를 포함하는 면역 강화작용[4,5], virus 감염 치료와 rheumatitis성 질환 및 노인성 골다공증(osteoprosis senile)의 치료에 효과가 있다고 보고하고 있다[6,7]. 이외에 GE-132의 해열, 진통작용 그리고 중금속 해독작용 등의 다양한 약리작용이 밝혀지고 있으며[8~10] 최근에는 AIDS의 치료와 예방에 대한 가능성도 제시되고 있다[11]. 또한, 세포의 산소 공급을 증가시키는 작용과 세포 손상을 유발하는 free radical의 제거 효과가 있어서 생체의 기능을 개선하여 방어기전에 기여할 것이라는 GE-132의 연구 보고[12] 및 저자 등[13]은 bromobenzene의 해독기전에도 GE-132가 효과가 있음을 보고한 결과를 토대로 하여 GE-132의 또 다른 해독기전을 추구할 목적으로 GE-132가 간 cytosolic glutathione S-transferase (GST)에 미치는 영향을 관찰하였다.

재료 및 방법

동물 및 처치

한국실험동물개발로 부터 분양받은 체중 150g 내외의 외견상 건강한 Sprague-Dawley종의 웅성 흰쥐 및

†To whom all correspondence should be addressed

20~25g의 ICR계 웅성 생쥐를 사용하여 고형사료 및 일정한 조건(온도 : 20±2°C, 습도 : 50%, 명암 : 12시간 light/dark cycle)하에서 충분히 적응시킨 후 사용하였다. 유기게르마늄은 생리 식염수에 용해하여 50~200 mg/kg을 6주간 oral needle를 사용하여 경구 투여하였으며, ethacrynic acid의 투여는 이[14]의 방법에 따라 85 mg/kg을 1% tween 80에 현탁하여 복강내로 1회 주사하였고, 급성독성 실험은 생쥐 20마리를 한 군으로 하여 170mg/kg을 1회 주사한 다음 실시하였다. 대조군은 동일량의 1% tween 80을 복강내로 주사하였다. 실험동물은 처치전 24시간 동안 물만 공급하고 절식시켰다.

효소원의 조제

동물의 처치는 CO_2 gas로 마취시켜 복부 정중선을 따라 개복한 다음, 복부 대동맥으로 부터 채혈하여 실혈사 시키고, 생리 식염수로 간을 관류하여 간내에 남아 있는 혈액을 제거한 후 간장을 적출하였다. 적출한 간은 생리 식염수로 세척한 다음 여과지로 생리식염수를 제거한 후 간 조직 1g당 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.5) 4배량을 넣고 빙냉하에서 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄액을 600×g에서 10분간 원심분리하여 침전물과 상등액을 얻었다. 이 상등액을 분획별로 centrifugation하여 cytosolic fraction을 분리하고서 아래의 효소원으로 사용하였다. 상기의 조작은 0~4°C에서 행하였다.

Glutathione S-transferase 활성 측정

Habig 등의 방법[15]에 준하여 0.1M potassium phosphate buffer (pH 6.5)중에 0.04M reduced glutathione 0.075ml를 가한 후 효소액을 0.1ml 넣고 blank에는 20% TCA 0.5ml를 가해 600×g에서 원심분리하여 단백질을 제거하고 시료는 25°C에서 5분간 반응시켰다. Blank와 시료 각 각에 기질로서 0.12M 1-chloro-2,4-dinitrobenzene 0.025ml 가하여 25°C에서 2분간 반응시킨 후 시료에 20% TCA를 가해 반응을 완결시켰다. Blank와 시료 각 각을 원심분리하여 얻은 상징액을 340nm에서 흡광도를 측정한 다음 1-chloro-2,4-dinitrobenzene의 mole 흡광계수 $9.6mM^{-1}cm^{-1}$을 이용하여 활성도를 산정하였다. 효소활성의 단위는 1분간 mg protein이 생성한 2,4-dinitrobenzene-glutathione의 nmole수로 표시하였다.

γ-Glutamylcystein synthetase의 활성 측정

Meister와 Richman의 방법[16]에 준하여 반응액 1ml 중에 0.1M Tris HCl buffer (pH 8.0)에 8.9mM L-glutamic acid, 0.94mM EDTA · Na, 3.2mM $MgCl_2$, 1.35mM ATP · Na 및 1mM L-α-aminobutyric acid에 효소원(100~200μg의 단백질)을 가한 후 37°C에서 10분간 반응한 후 10% TCA로 반응을 완료시키고 상징액에 유리되는 Pi를 molybdic acid와 aminonaphthol sulfonic acid를 가하여 생성되는 황색을 600nm에서 흡광도를 읽고 표준곡선에 의하여 산정하였다. 효소 활성도는 1분당 1mg의 단백질이 생성하는 Pi의 양을 nmoles로서 표시하였다.

Glutathione reductase의 활성 측정

Mize와 Langdon의 방법[17]에 따라 반응액 3ml 중에 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 0.94mM EDTA · Na, 4.6mM oxidized glutathione, 0.16mM NADPH 및 효소원(400~600μg의 단백질)을 가한 후 30°C에서 10분간 반응시켜 340nm에서 NADPH의 감소율을 측정하여 표준곡선에서 glutathione의 생성량으로 산정하였다. 효소의 활성도는 1분당 1mg의 단백질이 생성하는 glutathione의 양을 nmole로 표시하였다.

간조직 중 glutathione의 함량 측정

Ellaman의 방법[18]에 준하여 효소원(400~600μg의 단백질)에 제단백 시약으로 4% sulfosalicylic acid를 가하여 단백질을 제거한 상징액에 disulfide reagent (0.1M sodium phosphate buffer (pH 8.0) 중 5,5′-dithiobis (2-nitro benzoic acid를 녹임) 2.7ml를 가하여 생성되는 청색을 412nm에서 흡광도를 측정하고 표준곡선에 의하여 산정하였으며, 단위는 조직 1g당 glutathione μmole로 표시하였다.

단백질 정량

단백질의 함량은 Lowery 등의 방법[19]에 준하여 bovine serum albumin (Sigma, Fr. V)을 표준품으로 하여 측정하였다. 본 실험에 얻어진 결과는 Duncan's multiple range test를 이용하여 통계적 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

GE-132의 투여 용량에 따른 GST의 활성 변동

전보[13]에서 GE-132의 단독투여는 epoxide hydrolase 활성에 영향을 나타나지 않는 점을 토대로 다른 해독계인 GST의 활성에 GE-132의 투여 용량을 달리하면서 효

소의 활성을 측정한 성적은 Table 1과 같다. GE-132의 투여 용량을 50mg/kg, 100mg/kg, 150mg/kg 및 200 mg/kg으로 증량할 때 50mg/kg의 투여에서는 대조군과 별다른 영향이 없었으나 100mg/kg의 투여에서 부터 본 효소의 활성이 약 26% 증가 되었으며, 이하의 실험에서도 GE-132의 투여 용량에 따라 유의성 있게 본 효소의 활성이 증가되었다.

GE-132의 시험관내 GST 활성 및 반응속도론적 특성에 미치는 영향

In vivo 실험에서 GE-132의 투여로써 본 효소의 활성이 유의성 있게 증가됨을 관찰할 수 있었으므로 이러한 작용이 GE-132의 직접적인 작용에 의한 것인지의 여부 및 GST와 기질과의 친화력 및 반응 속도에 GE-132의 투여가 어떠한 영향을 주는가를 검토한 성적은 Fig. 1 및 2와 같다. 시험관내에 GE-132의 첨가 농도를 증가시켜 가면서 간 cytosolic GST의 활성에 어떠한 영향을 주는가를 관찰하였던 바 GE-132를 300μg/ml 까지 시험관내에 첨가하여도 간장중의 GST 활성은 대조치와 별다른 변동은 관찰되지 않았다. 한편 생리식염수를 투여한 실험군과 GE-132의 단독 투여군에서의 간으로부터 얻은 효소원의 반응액에 기질의 첨가 농도를 달리하면서 GST의 활성을 측정하여 Lineweaver-Burk plot[20]로 나타내었을 때 GE-132의 단독 투여군의 Vmax치가 1605.3nmoles/mg protein/min인데 비해 생리식염수를 투여한 대조군의 Vmax치는 1087.5nmoles/mg protein/min로서 GE-132의 투여군이 약 48% 정도 증가됨을 관찰할 수 있었으나 Km치는 각 각 303μM, 334μM로서 별다른 차이가 없었다. 이러한 결과로 보아 GE-132의 투여에 의한 GST의 활성 증가 현상은 GE-132의 직접적인 작용 보다는 본 효소 단백질의 합성 유도작용에 기인되어 나타나는 것으로 생각된다.

Table 1. Dose response for GE-132 on the hepatic cytosolic glutathione S-transferase activity in rat

Treatment	Dose (mg/kg)	Activity (2,4-nitrobenzene-glutathione nmole/mg protein/min)	% of control
Control	–	980.8±43.20[a]	100
GE-132	50	1039.6±35.79[a,b]	106
	100	1235.8±55.40[c]	126
	150	1245.6±56.34[c]	127
	200	1265.2±55.73[c]	129

Rats were orally administered GE-132 (50mg/kg,100mg/kg, 150mg/kg, 200mg/kg) daily for 6 weeks, and killed 24hr after the last dose. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for 6 experiments. Values followed by the same letter are not significantly different ($p<0.05$)

Ethacrynic acid 투여에 따른 GST 활성에 미치는 GE-132의 효과

Table 1에서 GE-132의 전처리로 정상동물에서도 GST의 활성이 증가됨을 관찰하고서 GST를 매개로 하여 대사되는 물질로 알려진 ethacrynic acid를 투여하였을 때 본 효소에 어떤 영향을 주는가를 관찰하기 위하여 활성을 측정하여 본 결과(Table 2)이다. Ethacrynic acid는 강력한 이뇨제로서 α,β-unsaturated ketone moiety

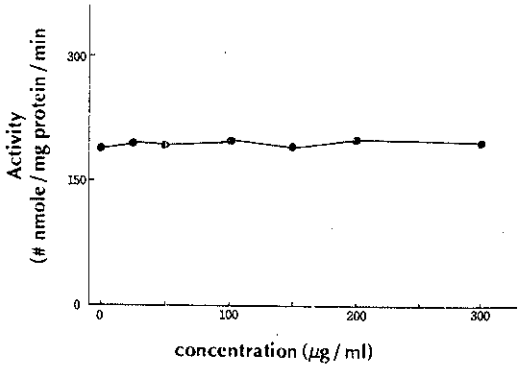

Fig. 1. Effect of GE-132 on the hepatic cytosolic glutathione S-transferase activity *in vitro*.
The assay procedure was described in the experimental methods.
Values are mean for 3 separate experiments.
; conjugated 2,4-dinitrobenzene-glutathione

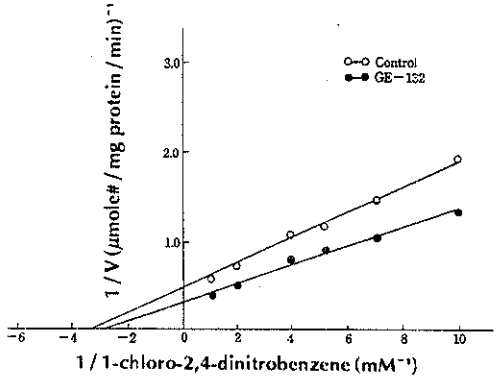

Fig. 2. Double reciprocal plots of the hepatic cytosolic glutathione S-transferase activity as a function of l-chloro-2, 4-dinitrobenzene at fixed level of reduced glutathione (1mM).
Rats were orally administered GE-132 (100mg/k) daily for 6 weeks and killed 24hr after the last dose. The assay procedure was described in the experimental methods. Data points represent means for 3 experiments.
; conjugated 2,4-dinitrobenzene-glutathione.

를 갖는 물질[21]이며 과량 복용 시 간장, 신장 및 심장 등의 장기에 괴사 현상을 나타낸다고 알려져 있으며[22,23] GST에 의해 glutathione과 포합하므로 무독화된다[24,25]. 그러므로 GST활성에 미치는 GE-132의 영향을 ethacrynic acid를 model 약물로 한 동물을 대상으로 관찰하였던 바, 생리식염수를 투여한 대조군에 비해 ethacrynic acid 투여군은 약 25% 정도 억제되던 것이 GE-132를 전처리하고 ethacrynic acid를 투여하므로써 대조군 수준에 가깝게 증가되었다.

Ethacrynic acid 투여에 따른 glutathione 함량 및 생성계에 미치는 GE-132의 영향

생리식염수와 GE-132를 투여한 실험 동물에 ethacrynic acid를 주사하고 간 조직 중 glutathione의 함량 변동, γ-glutamylcystein synthetase 및 glutathione reductase의 활성 변동을 관찰한 성적이 Table 3이다. 대조군에 비해 ethacrynic acid를 투여한 군은 glutathione의 함량이 약 34% 감소하였으나, GE-132를 전 처리한 다음 ethacrynic acid를 투여한 군은 대조군 수준에는 미치지 않으나 ethacrynic acid 단독투여군 보다는 glutathione의 함량이 증가되었다. 친 전자성 물질들과 활성산소 및 과산화지질의 최종적인 무독화 과정에서 필연적으로 glutathione이 요구되며[26,27], 이 물질의 세포내 함량 유지는 합성계 효소[28,29]와 해독 반응 후 생성되는 산화형 glutathione의 재환원 효소[17]가 관여하고 있는 점을 감안할 때 ethacrynic acid 투여 시 감소되는 glutathione의 함량이 GE-132의 전처리로 간 조직 중 glutathione의 함량 증가 현상을 구명할 목적으로 합성계의 제한 효소인 γ-glutamylcystein synthetase[28]의 활성과 재환원 효소인 glutathione reductase 활성의 변동을 GE-132를 전처리하여 관찰하였을 때, γ-glutamylcystein synthetase의 활성에는 별다른 영향이 없었으나 glutathione reductase의 활성은 대조군 보다 ethacrynic acid를 투여하므로써 현저히 억제되던 것이 GE-132를 전처리하므로서 대조군 수준으로 증가되고 있음을 관찰하였다. 이로보아 ethacrynic acid의 투여로 인한 간 glutathione 함량이 감소되던 것이 GE-132의 전처리로 증가되는 것은 GE-132가 glutathione reductase의 활성을 유도하여 나타나는 결과로 생각된다.

Table 2. Effect of GE-132 pretreatment in the hepatic glutathione S-transferase activity in ethacrynic acid-treated rat

Treatment	Activity (2,4-nitrobenzene-glutathione nmole/mg protein/mim)	% of control
Control	980.8±43.2[a]	100
Ethacrynic acid (EA)	735.7±33.4[b]	75
GE-132 + EA	1049.5±45.3[a,c]	107

Rats were orally administered GE-132 (100mg/kg) daily for 6 weeks and ethacrynic acid (85mg/kg, i.p. once a day). Rats were decapitated 16hr after the injection of ethacrynic acid treatment. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for 6 experiments. Values followed by the same letter are not significantly different ($p<0.05$)

Table 4. Effect of GE-132 on the mortality of mouse after ethacrynic acid treatment[1,2]

Treatment	Mortality (%)		
	24	48	72 (hr)
Ethacrynic acid (EA)	70.8±2.70[a,b]	84.6±1.15[a]	89.5±0.86[a]
GE-132 + EA	32.3±0.95[b]	36.4±2.07[b]	39.5±0.97[b]

Mice were administered GE-132 (100mg/kg) p.o. daily for 6 weeks. Ethacrynic acid (170mg/kg) 24hr after the last dosing GE-132

[1] The assay procedure was described in the experimental methods

[2] Each value are the mean±S.D. (n=3)

[3] Values followed by the same letter are not significantly different ($p<0.05$)

Table 3. Effect of GE-132 on the hepatic glutathione content, γ-glutamylcystein synthetase (γ-GT) and glutathione reductase (GR) activities in ethacrynic acid-treated rat

Treatment	Glutathione level	γ-GT	GR
	μmole/g of tissue	pi formed nmole/mg protein/min	glutathione formed nmole/mg protein/min
Control	4.75±0.92[a]	12.98±1.37[NS]	23.25±2.59[a]
GE-132	6.19±0.54[b]	14.29±2.15	32.50±2.54[b]
Ethacrynic acid (EA)	3.11±0.24[c]	12.78±1.16	14.52±1.56[c]
GE-132 + EA	3.60±0.13[d,c]	12.55±1.43	21.55±1.72[a,d]

Rats were orally administered GE-132 (100mg/kg) daily for 6 weeks and ethacrynic acid (85mg/kg, i.p. once a day). Rats were sacrificed 16hr after the injection of ethacrynic acid-treated. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for 6 experiments. Values followed by the same letter are not significantly different ($p<0.05$). NS ; not significant

Ethacrynic acid의 급성독성에 미치는 GE-132의 효과

GE-132의 해독 기능을 관찰하기 위하여 GE-132를 전처리하고 ethacrynic acid(170mg/kg)를 1회 복강 주사하고 3일간의 생쥐의 사망율을 관찰한 성적이 Table 4이다. Ethacrynic acid의 단독 투여군의 사망율을 24시간, 48시간 및 72시간 관찰하였을 때 사망율이 현저히 증가되었으며, GE-132를 전처리하고 ethacrynic acid를 투여한 군에서는 단독 투여군 때 보다 사망율이 현저히 감소($p<0.05$)되었다. 따라서 ethacrynic acid의 치사량을 실험동물에 투여하였을 때 사망 정도가 현저히 증가되던 것이 GE-132를 전처리하고 ethacrynic acid를 투여하므로써 사망률이 현저히 감소되었다. 이상의 실험결과와 문헌상의 지견들을 종합하여 볼 때 GE-132는 GST의 단백질 합성을 증가시켜 생체내 투여되는 독성물질의 독작용을 경감시킬 것으로 사료된다.

요 약

GE-132가 rat 간 cytosolic glutathione S-transferase (GST)의 활성에 어떠한 영향을 주는가를 검토할 목적으로 실험을 행한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다. 정상동물에서 반응 용량시험에 대한 기초적 실험에서 GE-132를 투여하였을 때 GST의 활성은 증가되었다. *In vitro* 실험에서 GE-132를 시험관내에서 첨가 농도를 증가시켰으나 GST의 활성에는 별다른 영향이 없었으며, 대조군과 GE-132의 투여군에서 GST와 기질과의 친화력 및 반응속도를 관찰하였을 때 Km치에는 별다른 영향이 없었으나 Vmax치는 증가되었다. 또한, ethacrynic acid를 주사하였을 때 GST의 활성이 현저히 감소되던 것이 GE-132의 투여로 대조군 수준으로 증가되었으며 조직내 glutathione의 함량 변동은 ethacrynic acid 투여로 억제되던 것이 GE-132의 전처리로 ethacrynic acid 단독 투여군 보다 증가되었으며 γ-glutamylcystein synthtase의 활성은 각 실험군에서 별다른 영향이 없는데 비해 glutathione reductase의 활성은 ethacrynic acid투여로 억제되던 것이 GE-132의 전처리로 대조군 수준으로 활성을 유지하고 있었다. 한편 GE-132를 전처리한 실험군에서 ethacrynic acid에 의한 사망률도 감소되었다.

감사의 글

본 연구는 1992년도 동아대학교 학술연구 조성비에 의한 연구 결과의 일부이며 이를 감사드립니다.

문 헌

1. Kumamoto, N., Nakai, Y., Ishilawa, T., Koinumara, S., Suzuki, S., Kikumoto, T. and Konno, K. : Effects of carboxyethylgermanium sesquioxide on the methylcholanthrane-induced tumoriogenesis in mice. *Sci. Rep. Inst. Tohoku Univ.*, **25**, 89 (1978)
2. Ishida, N., Suzuki, F. and Hayashi, Y. : Antitumor effects of organogermanium compound (GE-132) in mouse tumors. *Proc. Jpn. Cancer Assoc.* Ⅱ, Annual Meeting, p.193 (1979)
3. Mochizuki, H. and Kada, T. : Antimutagenic effect of GE-132 on γ-ray induced mutation in *Escherichia coli* B/r WP2 trp-. *Int. J. Radiat. Biol.*, **42**, 653 (1982)
4. Suzuki, F., Brutkiewicz, R. R. and Pollard, R. B. : Importance of T-cell and macrophages in the antitumor activity of carboxyethylgermanium sesquioxide (GE-132). *Anticancer Res.*, **5**, 479 (1985)
5. Suzuki, F., Brutkiewicz, R. R. and Pollard, R. B. : Cooperation of lymphokine (s) and marcrophages in expression of antitumor activity of carboxyethylgermanium-(GE-132). *Anticancer Res.*, **62**, 177 (1986)
6. Dimartino, M. J. : Antiarthritic and immunoregulatory activity of spirogermanium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **236**, 103 (1986)
7. Aso, H., Suzuki, F., Ebina, T. and Ishida, N. : Antivial activity of carboxyethylgermanium sesquioxide (GE-132) in mice infected with influenza virus. *J. Biol. Respose Mod.*, **8**, 180 (1989)
8. Komuro, T., Kaimoto, N., Katayama, T. and Hazato, T. : Inhibitory effects of GE-132 derivatives on enkephalin-degrading enzymes. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **8**, 379 (1986)
9. Hachisu, M., Takahashi, H., Koeda, T. and Sekizawa, Y. : Analgesics effect of novel organogermanium compound, GE-132. *J. Pharmacobiodyn.*, **6**, 814 (1893)
10. Lee, H. M. and Chung, Y. : Effect of organic germanium on metallothionein induction in liver and kidney of cadnium and mercury intoxicated rats. *Yakhak Hoeji*, **35**, 99 (1991)
11. Walker, C. M., Moody, D. J., Stites, D. P. and Levy, J. A. : CD8 lymphocytes can control HIV infection in *vitro* by suppressing virus replication. *Science*, **234**, 1563 (1986)
12. Harisch, G. : Glutathione and glutathione-dependent enzymes of the rat liver after different doses of sanumgerman. In : 1st Int. Conf. on Germanium. Hanover, Oct. 1984. Lekin and Samochowiec, eds., Semmelweis-Verlag (1985)
13. 김석환, 조태현, 최종원 : 유기게르마늄(GE-132)이 bromobenzene의 대사계에 미치는 영향. 한국영양식

량학회지, **22**, 702 (1993)
14. Lee, S. I. : Effect of diallyl disulfide on the hepatic glutathione S-transferase and glutathione peroxidase activities in mice. *Ph. D. Thesis.*, Yeungnam Uni., p.7 (1989)
15. Habig, W. H., Pabist, M. J. and Jakoby, W. B. : Glutathione S-transferase. The first step in mercapturate acid formation. *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130 (1974)
16. Meister, A. and Richman, P. G. : Regeneration of γ-glutamylcystein synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J. Biol. Chem.*, **250**, 1422 (1975)
17. Mize, C. E. and Langdom, R. G. : Hepatic glutathione reductase. : 1. Purification and general kinetic properties. *J. Biol. Chem.*, **237**, 1589 (1962)
18. Eliman, G. L. : Tissue sulfhydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70 (1959)
19. Lowry, O. H., Rosebrough, N. H., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurent with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
20. Engel, P. C. : Enzyme kinetics ; The steady-state approach. 2nd ed., Chapman and Hall, London and N. Y., p. 17 (1981)
21. Schultz, E. M., Cragoe, E. J. Jr., Bicking, J. B., Biohofer, W. A. and Sprague, J. A. : α, β-unsaturated ketone derivatives of aryloxyacetic acids, a new class of diuretics. *J. Med. Pharm. Chem.*, **5**, 660 (1962)
22. Ahokas, J. T., Davies, C., Ravenscroft, P. J. and Emmerson, B. T. : Inhibition of soluble glutathione S-transferase by diuretic drugs. *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 1929 (1984)
23. Gennaro, A. R. : Remington's pharmaceutical sciences. 17th ed., Mack Publishing Co., Pennsylvania, p.942 (1985)
24. Klassen, C. D. and Fitzerrald, T. J. : Metabolism and biliary excretion of ethacrynic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **191**, 548 (1974)
25. Ahokas, J. T., Nicholias, F. A., Ravenscroft, P. J. and Emmerson, B. T. : Inhibition of purified rat liver glutathione S-transferase isozymes by diuretic drugs. *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 2157 (1985)
26. Little, C. and O'Brien, P. J. : An intracellular GSH-peroxidase with lipid peroxide substrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 145 (1985)
27. Lawrence, R. A. and Burk, R. F. : Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 952 (1976)
28. Meister, A. : Selective modification of glutathione metabolism. *Science*, **220**, 472 (1983)
29. Reddy, C. C., Tu, C. P. D., Burgess, J. R., Ho, C. Y., Scholz, R. W. and Massaro, E. J. : Evidence for the occurrence of selenium-independent glutathione peroxidase activity in rat liver microsome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 970 (1981)

(1994년 2월 28일 접수)