

## 혈중에 있어서 사염화탄소에 의한 간손상에 allopurinol의 영향

배지혜 · 윤종국<sup>†</sup> · 이상일\*

계명대학교 공중보건학과, \*계명전문대학 식품영양과

### Effect of Allopurinol Pretreatment on the Liver Damage in CCl<sub>4</sub>-treated Rat

Ji-Hye Bae, Chong-Guk Yoon<sup>†</sup> and Sang-Il Lee\*

Dept. of Public Health, Keimyung University, Tae gu 704-701, Korea

\*Dept. of Food and Nutrition, Keimyung Junior College Taegu 705-037, Korea

(Received August 23, 1995)

(Accepted September 12, 1995)

**ABSTRACT :** To evaluate the effect of xanthine oxidase on liver injury by CCl<sub>4</sub>, liver damage was induced both in allopurinol pretreated rats (500 mg/kg. ip) and control group by twice intraperitoneal injection of CCl<sub>4</sub> (0.1 ml/100 g body wt. 50% in olive oil) at interval of one day. Increases in the levels of serum alanine aminotransferase and liver weight/body weight (%) by CCl<sub>4</sub> were significantly smaller in allopurinol pretreated rats than in control whereas the hepatic microsomal glucose-6-phosphatase activities were significantly higher in allopurinol pretreated rats than control group by CCl<sub>4</sub> treatment. These results indicates that allopurinol pretreatment may reduce the liver damage in CCl<sub>4</sub> intoxicated rats. In rats either with CCl<sub>4</sub> or not, hepatic type O xanthine oxidase activities were significantly reduced by allopurinol pretreatment and the increasing rate of these enzymes to each control was remarkably lower in allopurinol pretreated rats than control. Liver cytosolic protein contents and aniline hydroxylase, aminopyrine demethylase activities were higher in allopurinol pretreated rats than control rats when animals were treated with CCl<sub>4</sub>. On the other hand, neither allopurinol pretreated nor CCl<sub>4</sub> treatment caused any significant changes in hepatic superoxide dismutase and catalase activities. Hepatic glutathione contents were higher in CCl<sub>4</sub>-treated rats than control, but no significant changes were found in both between the allopurinol treated rats and CCl<sub>4</sub>-treated rats pretreated with allopurinol, and glutathione and glutathione S-transferase activities were significantly reduced in CCl<sub>4</sub>-treated rats than control whereas these enzyme activities showed on significant change in both between allopurinol treated and CCl<sub>4</sub>-treated rats pretreated with allopurinol. It is concluded that xanthine oxidase reaction system augment CCl<sub>4</sub> induced liver injury via even oxygen free radical system.

**Key Words :** Carbon tetrachloride, Allopurinol, Xanthine oxidase, Aniline hydroxylase, Aminopyrine demethylase, Glutathione, Glutathione peroxidase, Superoxide dismutase

## I. 서 론

일반적으로 생체 조직 세포의 손상은 oxygen free radical generating system Battelli 등, 1973; Freeman 등, 1982; Nohl 등, 1980; Simon 등, 1981)에 의해 생성된 활성산소(Pryor, 1977; Granger 등, 1981; Greenwald 등, 1979)와 독성물질의 대사 중간체인 친전자성 물질(MacCay, 1982; Trush 등, 1982)에 의해

야기되며, oxygen free radical scavenging system (Boylard 등, 1969; Chow 등, 1974; Flohe 등, 1973; Fried, 1975)의 존재에 의해 생체는 보호받고 있는 것으로 알려지고 있다.

한편, xanthine oxidase는 생체내에서 purine체, heterocyclic compound 및 aldehyde류 대사에 관여하는 효소(X O: Krenitsky, 1973; Ramber, 1969; Duke 등, 1973)로서 이 효소반응에 의하여 생성된 oxygen free radical(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)은 생체의 독성 및 방어작용에 관여하는 것으로 보고(tubaro 등, 1976)되고 있다. 실험동물에

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

CCl<sub>4</sub>에 의한 간손상시 간 및 혈청중 본 효소의 활성이 증가되며, 이로 인하여 생성된 oxygen free radical은 CCl<sub>4</sub>의 대사산물인 trichloromethyl과 더불어 간손상을 더욱더 심화시킬 것이라는 보고(윤종국 등, 1993)가 있다. 그러나 CCl<sub>4</sub>중독시 oxygen free radical이 간손상에 가세할 것이라는 기전에 대해서는 불분명하다.

이에 본 연구에서는 xanthine oxidase가 CCl<sub>4</sub>에 의한 간손상 유발에 어떠한 영향을 미치는지를 검토코저 xanthine oxidase의 활성 억제제인 allopurinol(Kelly 등, 1968; Klinenberg 등, 1965; Massey 등, 1970)을 전처치한 다음 CCl<sub>4</sub>를 투여한 후 체중당 간 무게, 간단백질, 혈청 alanine aminotransferase 및 간조직중 glucose-6-phosphatase 활성을 통하여 간손상 정도와 O type xanthine oxidase의 활성, 약물대사 효소의 활성 및 해독에 관여하는 효소들의 활성을 측정하여 allopurinol을 전처치하지 않은 CCl<sub>4</sub> 투여군 및 대조군과의 상호 비교 검토하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 처치

동물은 시중에서 구입한 진양사료(조성; 조단백 15.0%, 조지방 2.0%, 조섬유 10.0%, 조회분 10.0%, Ca 0.7%, P 0.4%)로 성장시킨 210-230 g 정도의 외견상 건강한 S-D계 웅성흰쥐를 사용하였다. 실험동물을 대조군, CCl<sub>4</sub> 투여군, allopurinol 투여군 및 allopurinol 전처치한 후 CCl<sub>4</sub> 투여군 모두 4군으로 하였다. CCl<sub>4</sub> 투여는 사염화탄소를 olive oil과 1:1의 혼합액을 만들어 체중 100 g당 0.1 ml를 실험동물의 복강내로 1일 1회 2일간 주사하였다. Allopurinol은 사염화탄소 주사 2시간전에 Kg당 50 mg을 olive oil에 현탁시켜 복강내로 주사하였으며, 한편 대조군은 동량의 olive oil을 복강내로 주사하였다. 모든 실험동물은 처치전 24시간동안 물만주고 절식 시켰다.

실험동물의 처치는 ether 마취하열 복부정중선을 따라 개복한 다음 복부대동맥으로부터 채혈하고 생리식염수로 간을 관류하여 혈액을 제거한 후 적출하였다. 적출한 간은 무게를 칭량하고 효소시료조제에 제공하였다.

### 2. 효소시료의 조제

간조직 일정량을 절취하여 4배량의 0.25 M sucrose 용액을 가해 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다.

이 마쇄균질액(20%W/V)을 700xg에서 10분, 10,000xg에서 20분간 원심분리한 다음 다시 105,000xg에서 1시간동안 초 원심분리하여 mitochondria 분획, cytosol 분획 및 microsome 분획을 얻었다.

Cytosol분획은 xanthine oxidase, superoxide dismutase, glutathion S-transferase 활성 측정의 효소원으로, microsome 분획은 aniline hydroxylase 및 aminopyrine demethylase 및 glucose-6-phosphatase 활성측정 효소원으로, mitochondria 분획은 catalase 활성측정의 효소원으로 사용하였다. 한편 채취한 혈액은 실온에서 응고시킨 후, 원심분리하여 혈청을 얻고 실험에 사용하였다. 이상의 모든 조작은 2~4°C에서 행하였다.

### 3. 효소의 활성 측정

Aniline hydroxylase 활성 측정은 기질인 aniline으로부터 생성된 p-aminophenol을 비색정량하는 Kato 등(1968)의 방법, aminopyrine demethylase 활성은 aminopyrine을 기질로하여 생성된 formaldehyde를 Nash 시약으로 발색하는 Bidlack과 Lowry(1982)의 방법에 준하였다. Catalase의 활성은 기질인 hydrogen peroxide가 분해되는 정도를 측정하는 Aebi의 방법(1974)에 준하였고, glutathione S-transferase의 활성은 기질인 1-chloro-2,4-dinitrobenzene과 glutathione이 반응하여 생성된 thionether(conjugate)양을 측정하는 Habig 등(1974)의 방법으로 superoxide dismutase의 활성은 pyrogallol의 자동산화 억제정도를 측정하는 Marklund와 Marklund(1974)의 방법으로 측정하였으며, 활성단위는 pyrogallol의 자동산화를 50% 억제하는 것을 1 unit로 하여 단백질 1 mg당으로 나타내었다. Xanthine oxidase의 활성은 기질인 xanthine의 산화에 의해 생성된 uric acid의 함량을 측정하는 Stirpe와 Della(1969) 및 Yoon (1984)의 방법에 준하여 측정하였다. 이때 NAD<sup>+</sup>를 함유치않은 반응액으로 측정된 것을 Type O의 활성치로 NAD<sup>+</sup>를 함유시킨 반응액으로 측정된 것을 총 활성(type O+type O)으로 하였다. 또한 glucose-6-phosphatase 활성은 Hasushi (1974) 등의 방법으로 측정하였다. 한편 혈청중 alanine aminotransferase(ALT)의 활성은 Reitman과 Frankel의 방법(1957)에 따라 조제된 Kit 시약을 사용하여 측정하였다.

### 4. 간조직 단백질 및 glutathione 함량측정

단백질함량은 Lowry 등(1951)의 방법, glutathione 함량은 Ellman(1959)의 방법에 준하였다.

### III. 실험결과 및 고찰

#### 1. 간 및 혈청 xanthine oxidase 활성 변동

Allopurinol을 투여한 실험군 및 대조군에 있어서 간 및 혈청 xanthine oxidase 활성변동을 나타낸 것이 Table 1과 같다. allopurinol을 처치한 실험군의 간 및 혈청 xanthine oxidase 활성은 대조군에 비하여 각각 약 40%, 67%의 유의한 감소를 나타내었다. 이러한 실험 결과로 보아 allopurinol 처치한 실험군이 xanthine oxidase 결핍실험동물 모델로 확인되었다.

#### 2. Allopurinol 전처치한 후 CCl<sub>4</sub> 투여가 간손상에 미치는 영향

Table 2는 간손상의 지표를 이용하는 체중당 간 무게, 혈청 ALT 및 간조직 glucose-6-phosphatase 활성을 나타낸 것이다.

체중당 간 무게는 CCl<sub>4</sub> 투여군이 대조군보다 약 26%의 유의한 증가를 보였으며, allopurinol 전처치한 후 CCl<sub>4</sub> 투여군 역시 대조군에 비하여 약 15% 증가되었으나 그 증가율은 CCl<sub>4</sub>만 투여한 군보다 낮게 나타남을 알 수 있었다. 혈청중 ALT 활성은 CCl<sub>4</sub>를 투여하므로써 대조군에 비하여 약 7.4배의 현저한 증가를 보였으

**Table 1.** Effect of allopurinol pretreatment on the serum and liver xanthine oxidase activity in CCl<sub>4</sub>-treated rats

Groups	Liver	Serum
Control	2.23±0.24	29.96±2.44
Allopurinol	1.33±0.06***)	10.08±2.09***)

The assay procedure was described in the experimental methods. Rats received CCl<sub>4</sub> (0.05 ml/100 g body wt.i.p.) 2 times at the intervals of one day. Allopurinol (500 mg/kg, i.p.) pretreated 2 hr before the administration of CCl<sub>4</sub>. The rats were sacrificed 24 hr after last infection. Each value represents the mean±S.E. of 7 rats.

\*)Significantly different from the control group (\*\*; p < 0.01, \*\*\*; p < 0.001).

**Table 3.** Effect of allopurinol pretreatment on the hepatic microsomal protein content, xanthine oxidase (type O), aniline hydroxylase and aminopyrine demethylase activities in CCl<sub>4</sub>-treated rats

Parameters	Protein content	Xanthine oxidase	Aniline hydroxylase	aminopyrine demethylase
Control	79.72±3.74	0.50±0.24	27.00±5.82	34.68±1.67
CCl <sub>4</sub>	49.43±5.88***)	0.80±0.07***)	10.59±1.23***)	24.59±1.51***)
Allopurinol	72.24±0.3	0.29±0.01***)	33.18±6.18	38.80±1.90
Allo+CCl <sub>4</sub>	53.45±3.71	0.21±0.02***)	21.70±1.32***)	27.02±0.95***)

Other abbreviations are the same in Table 1.

\*)Significantly different from the control group.

\*)Significantly different from the allopurinol treated group.

\*)Significantly different from the CCl<sub>4</sub> treated rats.

Unit; <sup>1</sup>mg/wet. liver, <sup>2</sup>n mole uric acid/min/μg protein, <sup>3</sup>n mole aminophenol/hr/mg protein, <sup>4</sup>n mole HCHO/hr/mg protein.

며, allopurinol 전처치한 후 CCl<sub>4</sub> 투여군 역시 약 6배로 현저히 증가되었다. 그러나 실험동물에 allopurinol을 전처치 하므로써 본 효소활성증가율이 CCl<sub>4</sub>만 투여한 군보다 낮게 나타났다. 간손상시 활성이 감소된다는 microsomal glucose-6-phosphatase 활성(Hasushi 등, 1974)은 CCl<sub>4</sub> 투여군이 대조군보다 약 70% 현저히 감소되었으며 allopurinol 전처치 한 다음 CCl<sub>4</sub> 투여군 역시 50% 감소되었으나 본효소감소율이 CCl<sub>4</sub> 투여군에 비하여 낮게 나타났다.

이상 실험결과를 종합하여 볼 때 CCl<sub>4</sub> 투여시 allopurinol 전처치는 CCl<sub>4</sub> 투여에 의한 간손상 정도를 경미하게 유도시키고 있음을 알 수 있다.

#### 3. 간조직중 microsomal protein, xanthine oxidase, aniline hydroxylase 및 aminopyrine demethylase 활성 변동

Allopurinol 전처치한 실험동물에서 CCl<sub>4</sub>에 의한 간손상 정도가 경미하게 나타나는 기전을 구명하는 일환으로 CCl<sub>4</sub>의 활성화에 관여하는 microsomal cytochrome P-450에 상응하는 aniline hydroxylase 및 aminopyrine demethylase 활성(Haugen and Coon, 1976)과

**Table 2.** Effect of allopurinol pretreatment on the liver injury in CCl<sub>4</sub>-treated rats

Parameters	Liver weight per body wt (%)	Serum ALT <sup>1)</sup>	Glucose-6-phosphatase <sup>2)</sup>
Control	3.28±0.14	31.8±3.80	8.58±0.63
CCl <sub>4</sub>	4.13±0.19***)	230.0±8.75***)	2.77±0.54***)
Allopurinol	3.19±0.15	110.4±3.50***)	11.89±1.49
Allo+cc <sub>4</sub>	3.77±0.15* <sup>b</sup> )	190.0±9.36* <sup>b</sup> )	4.29±0.49*** <sup>b</sup> )

Other abbreviations are the same in Table 1.

\*)Significantly different from the control group.

\*)Significantly different from the allopurinol treated group (\*; p < 0.05, \*\*; p < 0.01, \*\*\*; p < 0.001).

Unit; <sup>1</sup>Karmen unit, <sup>2</sup>n mole Pi/min/mg protein.

**Table 4.** Effect of allopurinol pretreatment on the hepatic glutathione content, glutathione S-transferase, superoxide dismutase and catalase activities in  $\text{CCl}_4$ -treated rats

Groups	Parameters	Glutathione <sup>1)</sup>	Glutathione-S-transferase <sup>2)</sup>	Superoxide dismutase <sup>3)</sup>	Catalase <sup>4)</sup>
Control		4.10±0.25	410.00±25.47	25.00±2.5	186.85± 6.03
$\text{CCl}_4$		6.58±0.80* <sup>3)</sup>	315.05±20.50* <sup>3)</sup>	18.15±4.1	160.09±15.21
Allopurinol		4.50±0.35	380.55±30.78	20.20±2.8	180.00± 6.69
Allo + $\text{CCl}_4$		5.58±0.20	347.00±30.13	17.55±3.5	168.13±10.76

Other abbreviations are same in Table 1.

\*Significantly different from the control group ( $p < 0.05$ ).

<sup>1)</sup> $\mu$  moles/g of liver, <sup>2)</sup>Formed thioester n moles/min/mg protein, <sup>3)</sup>unit/mg protein, <sup>4)</sup>Decreased  $\text{H}_2\text{O}_2$  n mole/min/mg protein.

oxygen free radical 생성과 관련된 xanthine oxidase의 type O 활성(McCord와 Fridovich, 1968)을 측정하는 것이 Table 3과 같다.

Allopurinol 전처치한 실험군은 대조군보다 type O의 xanthine oxidase 활성이 약 42%의 유의한 감소를 보였으며, 특히 allopurinol 전처치한 후  $\text{CCl}_4$  투여군이  $\text{CCl}_4$ 만 투여한 군보다 약 73%의 현저한 감소를 보였다.

한편 간조직중 microsomal protein 함량, aniline hydroxylase 및 aminopyrine demethylase 활성은 allopurinol 투여군과 대조군간에는 별다른 차이를 볼 수 없었으며,  $\text{CCl}_4$  투여로 인한 microsomal protein 함량과 이들 효소들의 활성감소율은 allopurinol 전처치군이 대조군에 비해서 낮게 나타났다.

따라서 실험동물에  $\text{CCl}_4$  투여시 그 활성이 감소된다는 간 aniline hydroxylase 활성 및 aminopyrine demethylase 활성(Noguchi 등, 1982) 감소율이 대조군보다 allopurinol 전처치군에서 낮게 나타남은  $\text{CCl}_4$ 로부터 trichlomethyl ( $\text{CCl}_3$ ) free radical 생성율이 대조군보다 allopurinol 전처치군이 낮게 나타남을 암시해 주고 있다. 그러나 본 실험에서 실험동물에  $\text{CCl}_4$  투여시 allopurinol 전처치하므로써 oxygen free radical 생성에 관여하는 type O xanthine oxidase 활성(Granger, 1981) 감소율이 이들 약물대사효소활성감소율보다 오히려 크게 나타남을 알 수 있다. 이러한 실험결과로 볼 때  $\text{CCl}_4$ 에 의한 간조직의 손상이 trichlomethyl radical과 같은 electrophilic compound 뿐만아니라 oxygen free radical도 상당히 영향을 미칠 것이라는 가설(Yoon 등, 1993)과 본실험결과를 감안해 볼 때 allopurinol 전처치로 인한  $\text{CCl}_4$ 에 의한 간손상이 경미하게 나타남은 xanthine oxidase 활성이 현저히 억제된 allopurinol 전처치군에서는 cytochrome P-450에 의하여 생성된 trichlomethyl radical로 인한 간조직손상만 나타났을 뿐 oxygen free radical로 인한 조직의 손상은 별로 가세되지 않았기 때문인 것으로 생각된다.

#### 4. 간조직중 free radical scavenging 효소활성 및 glutathione 함량변동

일반적으로  $\text{CCl}_4$ 에 의한 간독성은 free radical 생성계와 더불어 해독계의 효소 활성변동에 의해서도 상당한 영향을 받은 것으로 알려져 있다(Chow와 Tappel, 1971; Leibovitz와 Siegel, 1980). 그러므로 본 실험조건에서  $\text{CCl}_4$ 에 의해 생성된 lipid peroxide 뿐만아니라 oxygen free radical 자체도 무독화시키는 간조직의 glutathione과 포함효소인 glutathione S-transferase 활성과 superoxide dismutase 및 catalase 활성을 측정하는 성적이 Table 4와 같다.

간조직중 glutathione 함량 및 이의 포함효소인 glutathione S-transferase 활성과 superoxide dismutase 및 catalase 활성에 있어서 allopurinol 전처치군과 대조군간에 통계학적 차이를 볼 수 없었다. 그리고  $\text{CCl}_4$  투여시 간조직 중 glutathione 함량과 glutathione S-transferase, superoxide dismutase 및 catalase 활성은 대조군 및 allopurinol 전처치군 사이에 통계학적 차이가 관찰되지 않았다.

그러므로 allopurinol 전처치에 의한  $\text{CCl}_4$ 의 간독성 작용의 감소현상을 free radical 해독계와도 무관한 것으로 생각된다.

이상 실험결과와 문헌상의 지견은 종합하여 볼 때 allopurinol 전처치로  $\text{CCl}_4$ 에 의한 간손상이 감소되는 현상은 allopurinol이 xanthine oxidase의 활성을 억제시켜, 이로 인하여 oxygen free radical 생성율이 감소되므로 나타난 결과로 생각된다.

## IV. 결 론

흰쥐에 allopurinol를 체중 Kg당 50 mg을 복강으로 1일 1회 2일간 투여한 뒤 간 및 혈청중 xanthine oxidase 활성을 측정하는 결과 대조군보다 본 효소활성이 현저히 감소되므로써 xanthine oxidase 결핍실험모델로

확인되었다.

이때 CCl<sub>4</sub> 투여(0.1 ml/100 g body Wt, 50% in olive oil, 1일간격 두번)로 인한 간무게, 혈청 alanine aminotransferase 활성 증가율과 간조직의 microsomal glucose-6-phosphatase 활성감소율은 allopurinol 전처치군이 대조군보다 낮게 나타났다. 따라서 allopurinol 전처치로 CCl<sub>4</sub>로 인한 간손상이 경미하게 나타남을 확인할 수 있었다.

Allopurinol 전처치후 CCl<sub>4</sub> 투여군에 있어서 type O xanthine oxidase 활성증가율이 CCl<sub>4</sub>만 투여한 군보다 낮게 나타났으며 CCl<sub>4</sub> 투여로 인한 간조직중 microsomal protein 함량, aniline hydroxylase 및 aminopyrine demethylase 활성 감소율은 allopurinol 전처치군이 대조군에 비해서 낮게 나타났다.

한편 CCl<sub>4</sub> 투여로 인한 간조직중 glutathine 함량과 이의 포함효소인 glutathione S-transferase 활성과 superoxide dismutase 및 catalase 활성에 있어서는 allopurinol 전처치군과 대조군간에는 통계학적 차이가 관찰되지 않았다.

이상 실험결과로 보아 allopurinol 전처치로 인한 CCl<sub>4</sub>로 유도된 간손상의 감소현상은 oxygen free radical의 생성율이 저하된 결과로 생각된다.

## 참고문헌

- Aebi, H. (1974): Catalase in "Methods of Enzymatic Analysis" (H. U. Vergmeyer, eds.). Academic Press. N.Y., **2**, 673-684.
- Battelli, M.G., Lorenzoni, E. and Stirpe, F. (1973): Milk xanthine oxidase type D(dehydrogenase) and type O(oxidase): Purification, interconversion and some properties. *Biochem. J.*, **131**, 191-198.
- Bidlack, W.R. and Lowry, G.L. (1982): Multiple drug metabolism: p-nitroanisoole reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation. *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 311-317.
- Boylard, E. and Chasseud, L.F. (1969): The role of glutathione and glutathione S-transferase in mercaptric acid biosynthesis. *Adv. Enzymol.*, **32**, 173-219.
- Chow, C.K. and Tappel, A.L. (1974): Response of glutathione peroxidase to dietary selenium in rats. *J. Nutri.*, **104**, 444-451.
- Duke, E.J., Joyce, P. and Ryan, J.P. (1973): Characterization of alternative molecular forms of xanthine oxidase in the mouse. *Biochem. J.*, **131**, 187-190.
- Ellman, G.L. (1959): Tissue sulfhydryl group. *Biochem. Biophys.*, **82**, 70-77.
- Flohe, L., Gunzler, W.A. and Schock, H.H. (1973): Glutathione peroxidase: A selenoenzyme. *FEBS Lett.*, **32**, 132-134.
- Freeman, B.A. and Crapo, J.D. (1982): Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, **47**, 412-426.
- Fried, R. (1975): Enzymatic and non-enzymatic assay of superoxide dismutase. *Biochemie.*, **57**, 657-660.
- Granger, D.N., Rutili, G. and MacCord, J.M. (1981): Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology*, **81**, 22-29.
- Greenwald, R.A. and Moy, W.W. (1979): Inhibition of collagen gelation by action of the superoxide radical. *Arthritis Rheumat.*, **22**, 251-259.
- Hasushi, Y. and Teschke, R. and Lieber, C.S. (1974): Increased CCl<sub>4</sub> hepatotoxicity and its mechanism after chronic ethanol consumption. *Gastroenterology*, **66**, 415-422.
- Haugen, D.A. and Coon, M.J. (1976): Properties of electrophoretically homogenous phenobarbital-inducible and  $\beta$ -naphthoflavon inducible forms of liver microsomal cytochrome p-450. *J. Biol. Chem.*, **251**, 7929-7939.
- Habig, W.H., Pabist, M.J. and Jakoby, W.B. (1974): Glutathione S-transferase: The first enzymatic step in mercapture acid formation. *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130-7139.
- Kato, R., Osima, T. and Tomizams, S. (1968): Toxicity and metabolism of drug in relation to dietary protein. *Jap. J. Pharmacol.*, **18**, 356-366.
- Krenitsky, T.A. (1973): Xanthine oxidase and aldehyde oxidase in purine and purine analogue metabolism. *Exp. Med. Biol.*, **41**, 57-64.
- Kelly, W.N., Rosenbloom, F.M., Miller, J. and Seegmiller, J.E. (1968): An enzymatic basis for variation in response to allopurinol. *J. Med.*, **278**, 287-293.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Leibovitz, B.E. and Siegel, B.V. (1980): Aspects of free radical reaction in biological system. *Aging. J. Gerontol.*, **35**, 45-56.
- Massey, V., Komai, H. and Palmer, G. (1970): On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by allopurinol and other pyrazolo[3,4-d] pyrimidines. *J. Biol. Chem.*, **245**, 2837-2844.
- Marklund, S. and Marklund, G. (1974): Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, **47**,

- 469-4.
- McCord, J.M. and Fridovich, I. (1968): The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, **243**, 5753-5758.
- MacCay, P.B. (1982): Specificity of a phenobarbital-induced cytochrome P-450 for metabolism of  $\text{CCl}_4$  to the trichloromethyl radical. *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 615-625.
- Noguchi, T., Fong, K.L., Lai, E.L., Alexander, M.M.K., Olson, L., Poyer, J.L. and MacCay, P.B. (1982): Specificity of a phenobarbital-induced cytochrome p-450 for metabolism of  $\text{CCl}_4$  to the trichloromethyl radical. *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 615-623.
- Nohl, H. and Jordan, W. (1980): The metabolic fate of mitochondrial hydrogen peroxide. *Eur. J. Biochem.*, **111**, 203-210.
- Pryor, W.A. (1977): Free radical in biology: Involvement of radical reactions in aging and carcinogenesis in medicinal chemistry, pp.331-361, Elsevier, Amsterdam.
- Ramber, C.R.H. (1969): A sensitive and non-radioactive assay for serum and tissue xanthine oxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, **74**, 828-835.
- Reitman, S. and Frankel, J.W., William S, J.N. and Elehjem, C.A. (1957): A colorimetric assay for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**, 58-63.
- Stirpe, F. and Della Corte, E. (1969): The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, **244**, 3855-3863.
- Simon, R.H., Scoggin, C.M. and Patterson, D. (1981): Hydrogen peroxide causes the fetal injury to human fibroblasts exposed to oxygen radicals. *J. Biol. Chem.*, **266**, 7181-7186.
- Trush, A.M., Mimnaugh, E.G. and Gram, T.E. (1982): Activation of pharmacologic agents to radical intermediates: Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 3335-3346.
- Tubaro, E., Banci, F., Lotti, B. and Corce, C. (1976): Xanthine oxidase activation in animal liver during infectious processes. *Arzneim-Forsch. (Drug Res.)*, **26**(12), 2185-2186.
- Yoon, C.G., Park, H.S. and Lee, S.I. (1993): Effect of dietary tungstate on the liver damage in  $\text{CCl}_4$ -treated rats. *J. Korean. Soc. Food Nutr.*, **22**(6), 678-684.
- Yoon, C.G. (1984): A modified colorimetric assay for xanthine oxidase in rat liver extracts. *Keimyung Research Journal (Keimyung junior college)*, **2**, 295-308.