

Effect of Cyclohexanone Treatment on the Serum Levels of Glutathione S-Transferase Activities in Acute Liver Damaged Rats

Hye-Jung Choi and Chong-Guk Yoon

Department of Public Health, College of Natural Science, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

To evaluate an effect of cyclohexanone (CHO) treatment on the serum levels of glutathione S-transferase (GST) activity in acute liver damaged animals, acute liver damage was induced in rats with pretreatment of 50% CCl₄ in olive oil (0.1 ml/100 g body wt) intraperitoneally 14 times every other day. To liver damaged rats, CHO (1.56 g/kg body wt, i. p.) was injected once and then rats were sacrificed at 4 hours after injection of CHO. Increasing rate of GST activity to the control in serum was higher in CHO-treated rats pretreated with CCl₄ than the CCl₄-pretreated those. All the more, the injection of CHO to the liver damaged rats led to more enhanced liver damage on the basis of liver functional findings, i. e., serum levels of alanine aminotransferase (ALT) activity, liver weight per body weight, and malondialdehyde content. The changing pattern of serum ALT activity was similar with that of GST activity, whereas that of liver in both enzymes differed more or less from each other; the liver GST activity in CHO-treated rats pretreated with CCl₄ being more increased tendency than that of CCl₄-pretreated rats. Concomitantly the injection of CHO showed a increasing tendency of liver GST activity compared with the control. Furthermore, CHO injection to the liver damaged rats showed somewhat higher Vmax in the kinetics of liver GST enzymes. In conclusion, injection of CHO to the liver damaged animals led to more increased activity of serum GST, and it may be chiefly caused by the alteration of membrane permeability.

Key Words: Cyclohexanone, Liver damaged rats, Serum glutathione S-transferase

서 론

Glutathione S-transferase (GST; RX: glutathione R-transferase; EC 2. 5. 1. 18)는 생체내에서 내·외적인 지용성 친전자물질에 glutathione을 포함시켜 해독에 관여하는 isoenzyme으로서 2개의 subunit로 되어 있으며 분자량은 47,000~49,000 dalton이다¹⁰. 본 효소는 동식물, 미생물, 포유동물 등 모든 생물체 내에 존재하고¹⁰, 특히 포유동물에 있어서는 간, 소장, 신장 외 모든 장기에 존재하며 간조직에서 가장 높은 활성치를 나타내며⁷ 세포내에서는 모든 분획에 존재하지만 세포질 내에 가장 높은 활성치를 나타내는 것으로 알려져 있다^{13,14}. 그리고 GST는 사염화탄소 (이하 CCl₄라 함)에 의한 간손상시 혈청 중 활성이 증가된다는 보고²⁰가 있다. 그러므로 혈청 중 GST 활성 측정은 여러 가지 xenobiotics에 의한 간손상의 지표로 이용될 수 있다고 생각된다.

한편 최근 산업의 급속한 발전에 따른 산업장 산업화학물

질의 인체폭로는 인간의 건강에 심각한 영향을 미치고 있다. 이같은 산업화학물질로서 xenobiotics의 일종인 cyclohexanone (이하 CHO라 함)은 나일론 합성의 부산물질이며 유기용제로 널리 이용되고 있다¹⁶. 또한 CHO는 cyclohexane이 생체에 폭로시 생체내의 cytochrome P450에 의하여 생성된 중간대사산물로서도 알려져 있다^{6,8}.

일반적으로 xenobiotics의 생체내 독성현상은 생체내 병태 생리적 조건에 따라 달리 나타나는 것으로 알려져 있으며 실험동물에 있어서 CCl₄에 의한 간손상이 xylene⁴, toluene⁵ 및 bromobenzene³을 투여시에 더욱 심화됨이 보고되었다. 따라서 실험동물에 CCl₄ 전처치한 다음 CHO 투여시 간손상이 심화될 것으로 예상되며 이와 같은 현상이 혈청 중 GST 활성에 영향을 미칠 것으로 생각된다.

이에 본 연구에서는 실험동물에 CCl₄를 전처치한 후 CHO를 투여한 다음 처치하여 혈청 중 GST 활성을 측정하고 이때 GST 활성 변동기전을 구명코자 간조직 중 GST 활성을 측정함과 동시에 기질농도 변동에 따른 반응속도를 관찰코자 하였다.

*논문 접수: 2001년 11월 5일

수정재접수: 2001년 12월 22일

†별책 요청 저자: 윤종국, Tel: 053-580-5230

재료 및 방법

1. 동물의 사육 및 처치

실험동물은 체중 200 g 내외의 외견상 건강한 Sprague-Dawley 종의 숫 흰쥐를 시중에서 구입한 동물사료(삼양사 제품)로 사육하여 실험에 사용하였다. 실험동물 28마리를 각각 7마리씩 대조군, CCl₄ 투여군, CHO 투여군 및 CCl₄ 전처치 후 CHO 투여군(이하 CCl₄ 전처치군)으로 분리하여 수용하였다. 이때 사육조건은 온도 25±1°C, 습도 50±5%로 하여 실험기간 동안 물과 사료를 제한없이 공급하였다.

CCl₄ 투여는 CCl₄를 olive oil과 1:1 혼합액을 만들어 체중 100 g 당 0.1 ml 씩 1일 1회 2일 간격으로 14회 복강 내로 주사하였다. CHO 투여군의 경우 체중 kg 당 CHO 1.56 g을 1회 복강으로 투여하였고, CCl₄ 전처치군은 CCl₄ 마지막 전처치한 다음 24시간 후 CHO를 위와 같이 주사하였다. CHO 투여군과 CCl₄ 전처치군에서 CHO 투여는 주사한 다음 4시간 후에 처치하였다.

동물의 처치는 ether 마취하에 복부 정중선을 따라 개복한 다음 복부 대동맥으로부터 채혈하여 처치한 후, 4°C 생리식염수로 간을 관류시켜 간조직 내에 남아 있는 혈액을 제거한 다음 적출하였다. 적출한 간은 생리식염수를 문정맥으로 주입하여 여지로 압박하고 간조직 내 남아 있는 생리식염수를 가능한 모두 제거한 다음, 무게를 칭량하였다. 채취한 혈액은 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻어 alanine aminotransferase (ALT) 활성 측정에 사용하였다.

2. 효소원의 조제

적출한 간조직 일정량을 칭량한 후 4배량의 0.25 M sucrose 용액을 가하여 빙냉하에서 glass teflon homogenizer로 마쇄균질액(20% W/V)을 만들었다. 이 균질액을 600×g에서 10분간 원심분리하여 침전된 핵 및 미마쇄부분을 제거한 후 상층액을 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 상층액을 취하여 glutathione S-transferase (GST) 활성 측정에 사용하였다. 한편 채취한 혈액은 방치한 다음 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻고 ALT 및 GST 활성 측정용 시료로 사용하였다.

3. 효소활성도 측정

1) 간 및 혈청 alanine aminotransferase (ALT) 활성도 측정

L-alanine과 α-ketoglutaric acid를 기질로 하여 효소 시료와 함께 37°C에서 30분간 반응시킨 후 생성된 pyruvic acid를 alkali 조건에서 2,4-dinitrophenyl hydrazine과 반응시켜 발색되는 색조를 비색 정량하는 Reitman과 Frankel의 방법¹⁸⁾에 따라 조

제된 kit 시액을 사용하였다. 활성도 단위는 ml 당 Karmen¹¹⁾ 단위로 표시하였다.

2) 간 및 혈청 중 glutathione S-transferase (GST) 활성도 측정

GST의 활성도 측정은 Habig 등의 방법⁹⁾에 준하였다. 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)과 glutathione을 기질로 하여 25°C에서 10분간 반응시키는 동안 생성된 2,4-dinitrobenzene-glutathione conjugation 양을 340 nm에서 측정하였다.

활성도 단위는 효소 반응액 중에 함유된 단백 1 mg이 1분 동안 반응하여 생성시킨 conjugation의 양을 nmole로 나타내었으며, 혈청 중에는 혈청 ml 당 conjugate nmole로 표시되었다.

한편 간조직 GST의 활성을 glutathione 농도를 변경시켜 가면서 측정한 후 각 활성과 glutathione의 농도의 역수를 선정하여 double reciprocal plot에 의해 Km 치 및 Vmax 치로 계산하였다.

4. Malondialdehyde (MDA) 함량 측정

간조직 중 MDA 함량은 Ohkawa 등의 방법¹⁵⁾에 준하였다. 즉 시료 속의 과산화지질을 산성 조건하에서 thiobarbituric acid와 가열 반응시켜 생긴 물질을 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. MDA 함량은 간조직 1g 당 nmole로 표시하였다.

5. 간조직 중 단백질 정량

단백질 정량은 Lowry 등의 방법¹²⁾에 준해 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 측정하였다.

6. 성적검정

실험성적의 통계처리는 Student's t-test¹⁹⁾로 하였으며 유의수준은 0.05 이하로 하였다.

결과 및 고찰

1. 혈청 중 GST 활성

CCl₄에 의한 급성 간손상시 흰쥐에 CHO 투여가 GST 활성에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 혈청 중 GST 활성을 나타낸 것이 Fig. 1과 같다. CHO만 투여한 실험군은 혈청 중 본 효소의 활성치가 33.44±4.18 (nmole/min/ml of serum)로서 대조군(41.80±4.82)에 비하여 약 20% 감소되는 경향을 보였으며, CCl₄ 투여군은 본 효소의 활성치가 116.06±12.86로서 대조군에 비하여 약 2.8배의 현저한(p<0.001) 증가를 보였다. CCl₄ 전처치군은 효소활성치가 250.27±42.50로서 CCl₄ 투여군에 비하여 약 2배의 유의한(p<0.05) 증가를 나타내었다.

본 실험에서 CCl₄ 전처치군에서 혈청 중 GST 활성치가 증

가됨은 Yang과 Carlson의 보고²⁰⁾와 유사하였다. 특히, CCl₄ 전처치군이 CCl₄ 투여군에 비하여 본 효소활성이 증가됨과 Yang과 Carlson의 보고²⁰⁾를 고려해 볼 때 CCl₄ 전처치군에 있어서 CHO 투여가 간손상을 심화시킴을 암시해 주고 있다. 그러므로 간손상 정도와 혈청 중 GST 활성과의 어떠한 관련성이 있는가를 검토코자 급성 간손상시에 증가된다는 체중당 간 무게, 혈청 중 ALT 및 간조직 중 MDA 함량²⁾을 관찰코자 하였다.

2. 체중당 간 무게, 혈청 ALT 활성 및 간조직 중 MDA 함량

CCl₄ 투여군에서 체중당 간 무게는 대조군에 비하여 약 27% 증가되었으며 CHO만 투여한 군은 대조군 간에 별다른 차이를 볼 수 없었다. 혈청 중 ALT 활성은 CCl₄ 전처치군이 대조군에 비하여 약 20배의 현저한 ($p < 0.001$) 증가를 보였으며 CHO 투여군은 대조군에 비하여 약 45% 증가되었으나 통계적인 유의성은 없었다. 그리고 간조직 중 MDA 함량은 CCl₄ 투여군이 대조군에 비하여 약 32% 증가되었으나 CHO 투여군은 대조군 간에 별다른 차이를 볼 수 없었다 (Table 1

참조). CCl₄를 실험동물에 투여시 CCl₄는 생체내에서 조직세포내 활면내형질세포의 복합산화기구에 의하여 trichloromethyl free radical ($\cdot\text{CCl}_3$)로 전환되어 세포막의 과산화를 초래하며, 또한 거대분자 및 효소의 불활성화 등에 따라 간세포 손상을 야기시키는 것으로 알려져 있다¹⁷⁾. 그러므로 본 실험에 있어서 CCl₄ 투여군이 대조군에 비하여 MDA 함량이 높게 나타남은 간세포막의 과산화에 따른 막손상으로, 세포부종 (swelling)이 일어나 체중당 간 무게의 증가현상이 수반된 것임을 알 수 있다. 이때 CCl₄에 의한 간손상시 혈청 중 ALT 활성 증가는 세포막 투과성 향진에 기인되어 나타난다는 사실¹⁾을 고려해 볼 때 본 실험조건에서와 같이 CCl₄ 전처치군은 xenobiotics성 간조직의 염성 반응이 심하게 나타남을 시사해 주고 있다. 특히, 본 실험조건에서 CCl₄ 전처치군이 CCl₄ 투여군에 비하여 체중당 간 무게는 약 60%의 유의한 ($p < 0.05$) 증가를 보였으며, 혈청 ALT 활성은 CCl₄ 전처치군이 CCl₄ 투여군 보다 약 48%의 유의한 ($p < 0.05$) 증가를 보였다. 또한 간조직 중 MDA 함량 역시 CCl₄ 전처치군이 CCl₄ 투여군에 비하여 약 14% 증가되는 경향을 보였다.

이상 실험 결과를 보아 CHO 단독 투여군에서는 간손상에

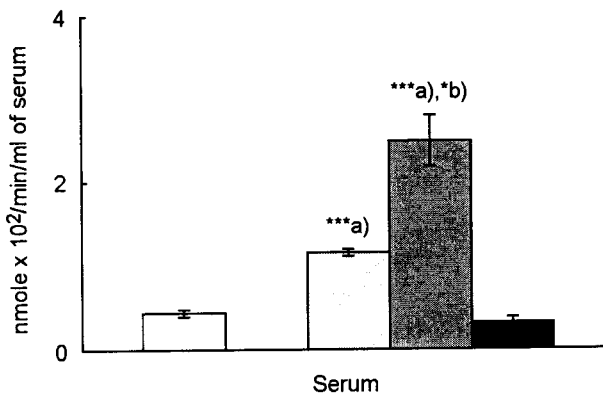


Fig. 1. Effect of cyclohexanone-treatment on the serum glutathione S-transferase activities in CCl₄-pretreated rats. Each value represents the mean \pm S.E. of 7 rats. ^{a)} Significantly different from the control, ^{b)} Significantly different from the CCl₄-treated rats (*; $p < 0.05$, ***; $p < 0.001$). □: Control, □: CCl₄-pretreated group, ■: Cyclohexanone-treated group pretreated with CCl₄, ■: Cyclohexanone-treated group

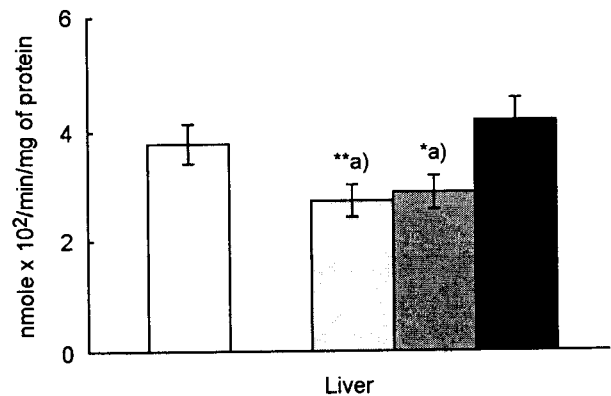


Fig. 2. Effect of cyclohexanone-treatment on the hepatic glutathione S-transferase activities in CCl₄-pretreated rats. Each value represents the mean \pm S.E. of 7 rats. ^{a)} Significantly different from the control (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$). □: Control, □: CCl₄-pretreated group, ■: Cyclohexanone-treated group pretreated with CCl₄, ■: Cyclohexanone-treated group

Table 1. Effect of cyclohexanone-treatment on the liver weight/body weight (LW/BW, %), serum levels of ALT and hepatic MDA content in CCl₄-pretreated rats

Group	Control	CCl ₄	CCl ₄ +CHO	CHO
LW/BW (%)	2.74 \pm 0.15	3.48 \pm 0.30	5.53 \pm 0.76 ^{***a)b)}	2.57 \pm 0.15
Serum ALT ¹⁾	25.00 \pm 2.80	510.30 \pm 70.90 ^{***a)}	756.25 \pm 85.20 ^{***a)b)}	36.25 \pm 4.80
MDA ²⁾	2.85 \pm 0.14	3.77 \pm 0.51	4.30 \pm 0.60 ^{*a)}	2.65 \pm 0.14

Each value represents the mean \pm S.E. of 7 rats. Unit: ¹⁾ Karmen unit/ml of serum, ²⁾ nmole MDA/g of tissue
^{a)} Significantly different from the control, ^{b)} Significantly different from the CCl₄-treated rats (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$)

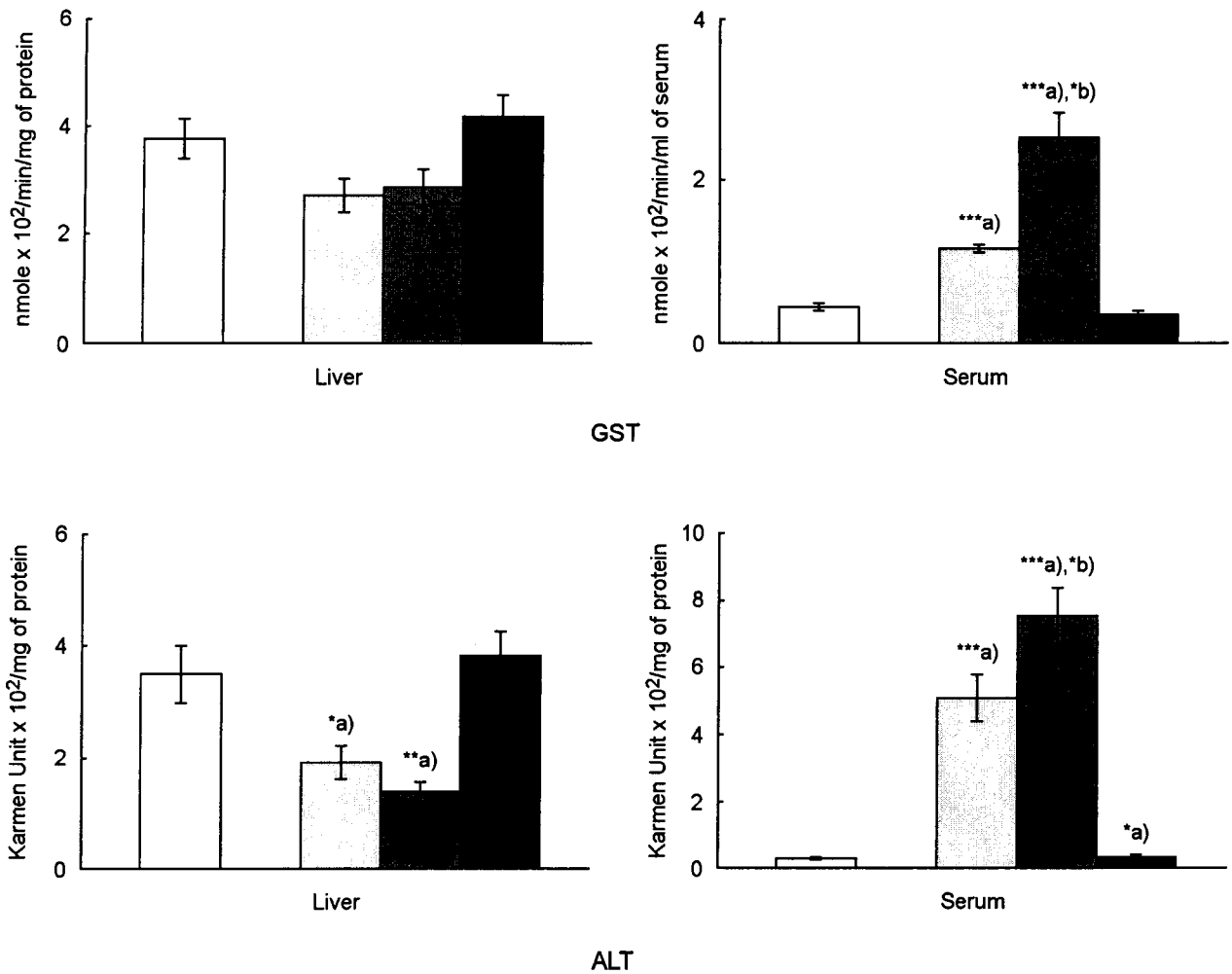


Fig. 3. Comparison of GST with ALT activity in liver and serum of cyclohexanone-treated rats with pretreated CCl₄. Each value represents the mean \pm S.E. of 7 rats. ^{a)} Significantly different from the control, ^{b)} Significantly different from the CCl₄-treated rats (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$). □: Control, ▨: CCl₄-pretreated group, ■: Cyclohexanone-treated group pretreated with CCl₄, ■: Cyclohexanone-treated group

별다른 변화가 나타나지 않음에도 불구하고 급성 간손상 실험동물에 CHO 투여는 간손상을 더욱더 심화시킴을 알 수 있다. 더욱이 간손상이 보다 더 심화된 CCl₄ 전처치군에서 혈청 GST 활성이 CCl₄ 투여군 보다 높게 나타남은 바로 간손상 정도 차이에 따라서 본 효소활성이 비례적으로 높게 나타남을 시사해 주고 있다. 이는 간기능 검사로 많이 이용되는 혈청 ALT 활성의 변동양상과 유사함을 알 수 있으며, 이러한 사실로 보아 간손상의 심화 정도를 검색하는데 혈청 중 GST 활성 측정이 상당한 의의가 있을 것으로 생각된다.

한편, 본 실험조건에서 CCl₄ 전처치군이 CCl₄ 투여군 보다 혈청 중 GST 활성이 증가되는 원인을 검토하는 일환으로 간조직 중 본 효소활성을 관찰하였다. 간조직 중 GST 활성에 있어서 CCl₄ 투여군 (273.55 ± 29.50 ; nmole/min/mg of protein)은 대조군 (376.61 ± 37.81)에 비하여 약 27%의 유의한 ($p < 0.01$)

감소를 보였으며 CCl₄ 전처치군 (287.78 ± 35.26)은 대조군에 비해서 약 23% 유의하게 ($p < 0.05$) 감소되었으나 CCl₄ 투여군 간에는 별다른 차이를 볼 수 없었다. 그리고 CHO 투여군 (418.72 ± 43.15)은 대조군에 비하여 약 12% 증가되는 경향을 보였다 (Fig. 2 참조). 따라서 CHO 투여군이 대조군 보다 본 효소활성이 다소 높게 나타남과 CCl₄ 전처치군과 CCl₄ 투여군 간에 GST 활성이 별다른 차이가 나타나지 않음과 더불어 혈청 중 CCl₄ 전처치군에서 본 효소활성이 증가된 점을 고려해 볼 때 CHO에 의한 GST 효소단백 유도성을 완전히 배제할 수는 없다.

본 실험에서 CCl₄ 투여군 및 CCl₄ 전처치군 모두 대조군 보다 간조직 중 GST 활성이 감소되는 반면, 혈청 중 본 효소의 활성은 모두 증가된다는 사실과 세포막 과산화현상의 지표인 MDA 함량이 CCl₄ 투여군 및 CCl₄ 전처치군 모두 대

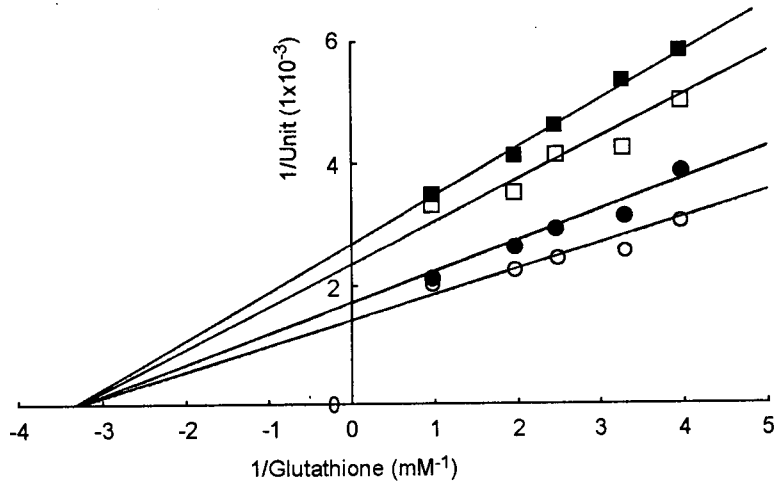


Fig. 4. Double reciprocal plots of the liver cytosolic glutathione S-transferase activity as a function of reduced glutathione at fixed level of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene. The value is mean \pm 3 experiences. Unit; nmoles conjugated 2,4-dinitrobenzen-glutathione/min/mg protein (1×10^{-3}), ●-●: control, ○-○: Cyclohexanone-treated group, □-□: Cyclohexanone-treated group pretreated with CCl_4 , ■-■: CCl_4 -pretreated group

조금 보다 높게 나타난 점으로 보아 두 실험군에서 간세포막 투과성 향진에 의하여 혈청 중 GST 활성이 증가된 것으로 생각된다. 더욱이 CCl_4 전처치군이 CCl_4 투여군 보다 혈청 중 GST 활성이 유의하게 ($p < 0.05$) 증가됨은 주로 CCl_4 투여군에 비하여 간손상에 의한 세포막 투과성이 보다 더 향진될 뿐만 아니라 본 효소단백의 유도에 기인된 것으로 생각된다. 윤 등¹⁾은 CCl_4 에 의한 급성 간손상시 혈청 중 ALT 활성 증가는 세포막 투과성 증가 때문이라고 하였다. 따라서 급성 간손상시 간세포막의 투과성 증가에 의하여 간조직에서 활성이 감소되는 반면 혈청 중에서 증가된다는 ALT 활성¹⁾을 GST 활성과 간 및 혈청 중에서 상호비교 검토하므로써 본 실험조건에 혈청 중 GST 활성 변동원인을 알아낼 수 있다고 생각된다. 이에 ALT와 GST 활성을 간 및 혈청 중에서 상호비교 검토한 것이 Fig. 3과 같다.

3. 간 및 혈청 중 ALT와 GST 활성 비교

본 실험조건에서 급성 간손상시 혈청 중 활성이 증가되며 간조직에서는 감소된다¹⁾는 ALT 활성을 간과 혈청 중에서 측정한 것이 Fig. 3과 같다. 간조직에 있어서 ALT 활성은 CCl_4 투여군 (194.8 ± 25.3 ; Karmen unit/ml of serum)이 대조군 (349.7 ± 51.5)에 비하여 약 44%의 유의한 ($p < 0.05$) 감소를 보였으며 CCl_4 전처치군 (142.0 ± 15.3)은 대조군에 비해서 약 59%의 유의한 ($p < 0.05$) 감소를 나타내었다. 따라서 CCl_4 전처치군이 CCl_4 투여군에 비해서 약 27% 감소되었다. 혈청 중에 있어서 CCl_4 투여군 (510.3 ± 70.9)은 대조군 (25.0 ± 2.8)에 비해서 약 20배의 현저한 ($p < 0.01$) 증가를 보였으며, CCl_4 전처치군 (756.3 ± 85.2)은 CCl_4 투여군에 비해서 약 48% 유의하게 ($p < 0.05$) 증가되었다. 이러한 실험 결과로 보아 CCl_4 전처치

한 다음 CHO 1회 투여함으로써 간손상이 보다 더 심화됨을 확인할 수 있다.

특히 본 실험조건에서의 혈청에 있어서 ALT 활성 변동이 GST와는 유사한 양상을 나타낸 점을 보아 CCl_4 전처치군에서 혈청 중 GST 활성 증가는 간세포막의 투과성 향진에 기인된 것으로 생각된다. 그러나 본 실험조건에서 CHO 투여군이 대조군 보다 간 GST 활성이 다소 증가됨과 동시에 CCl_4 전처치군이 CCl_4 투여군 보다 간 GST 활성이 약간 증가되는 것으로 보아 일단 GST 효소단백 유도성과 관련지어 GST 효소활성을 반응속도적 측면에서 관찰하였다.

4. GST의 반응속도

Glutathione 농도 변동에 따른 GST 효소활성을 측정하여 기질 및 효소단위의 역수에 따른 double reciprocal plot으로 작성한 것이 Fig. 4와 같다. 대조군에 있어서 Km 치는 2.94×10^{-4} M로서 Habig 등의 보고⁹⁾와 일치하였으며, CCl_4 투여군, CCl_4 전처치군 및 CHO 투여군 간에는 유사한 수치를 보였다. Vmax 치는 CHO 투여군이 625 nmole/min/mg protein으로서 대조군 (521) 보다 20% 높았으며, CCl_4 투여군, CCl_4 전처치군은 대조군에 비하여 각각 27, 37% 감소되었다. 특히 CCl_4 전처치군은 CCl_4 투여군에 비해서 13% 증가되었다. 따라서 CCl_4 전처치군에 있어서 CCl_4 투여군 보다 혈청 GST 활성이 증가된 것은 본 효소 단백질합성과는 무관하지 않은 점도 배제할 수 없다.

이상 실험 결과를 종합해 볼 때 CCl_4 전처치 후 CHO 투여시 혈청 중 GST 활성이 CCl_4 투여군 보다 증가됨은 주로 간세포막의 투과성 향진에 기인된 결과로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 계명대학교 대학원 학술연구 논문 연구비에 의해 수행된 연구 결과이며, 이에 감사 드립니다.

참 고 문 헌

- 1) 윤종국, 신중규, 정광식 (1991): 흰쥐에 사염화탄소 투여가 소장 및 간 Alanine Aminotransferase 활성에 미치는 영향. 연구논문집 (계명대학교 기초과학연구소), **10(2)**: 209-214.
- 2) 윤종국, 이미경, 이상일 (1998): 성장기간이 다른 흰쥐에 사염화탄소 투여가 Oxygen Free Radical 생성계 및 해독계 효소활성에 미치는 영향. 한국노화학회지, **8(1)**: 35-42.
- 3) 윤종국, 채순남, 전태원 (1996): 흰쥐에 있어서 CCl₄에 의한 간손상이 Bromobenzene 대사에 미치는 영향. 연구논문집 (계명대학교 기초과학연구소), **15(2)**: 229-304.
- 4) 이혜자, 조현국, 이상일, 전태원, 윤종국 (1999): 흰쥐에 xylene 반복투여가 xylene의 대사에 미치는 영향. 대한의생명과학회지, **5(1)**: 56-66.
- 5) 최우창, 차상은, 윤종국 (1997): 흰쥐에 있어서 사염화탄소에 의한 간손상이 toluene 대사에 미치는 영향. 한국산업위생학회지, **7(1)**: 61-69.
- 6) Deneke SM and Fanburg BL (1980): Normobaric oxygen toxicity of the lung. *N Engl J Med*, **303(2)**: 76-86.
- 7) Fleishner G, Kamisaka K, Gatmaitan F and Arias IM (1976): Immunologic studies of rat and human ligandin, In "Glutathione: metabolism and functions (Arias IM and Jakoby WB eds)", pp. 259-265, Raven, New York.
- 8) Freeman BA and Crapo JD (1982): Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest*, **47(5)**: 412-426.
- 9) Habig WH, Pabst MJ and Jakoby WB (1974): Glutathione S-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, **249(22)**: 7130-7139.
- 10) Jakoby WB and Habig WH (1980): Glutathione transferase, In "Enzymatic basis of detoxication (W. B. Jakoby ed)", Vol II, pp. 63-94, Academic Press, New York.
- 11) Karmen A (1955): A note on the spectrophotometer assay of glutamic oxaloacetic transaminase in human blood serum. *J Clin Invest*, **34**: 131-133.
- 12) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**: 265-275.
- 13) Mannervik B, Alin P, Guthenberg C, Jansson H, Tahir MK, Warholm M and Jornvall H (1985): Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci*, **82(21)**: 7202-7206.
- 14) Morgenstern R, DePierre JW and Jornvall H (1985): Microsomal glutathione transferase. Primary structure. *J Biol Chem*, **260(26)**: 13976-13983.
- 15) Ohkawa H, Ohish N and Yaki K (1979): Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal biochem*, **95**: 351-355.
- 16) Ong CN, Chia SE, Phoon WH, Tan KT and Kok PW (1991): Monitoring of exposure to cyclohexanone through the analysis of breath and urine. *Scand J Work Environ Health*, **17(6)**: 430-435.
- 17) Recknagel RO (1967): Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol Rev*, **19**: 145-147.
- 18) Reitman S and Frankel S (1957): A Colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am J Clin pathol*, **28**: 56-63.
- 19) Scheffler WC (1980): Statistics for the biological sciences. pp. 84-89. Addison-Wesley, London.
- 20) Yang CM and Carlson GP (1991): Effects of ethanol on glutathione conjugation in rat liver and lung. *Biochem Pharmacol*, **41(6-7)**: 923-929.