

家兎에서 nitrite에 의한 methemoglobinemia에 미치는 selenium의 影響

金鎮祥 · 韓正熙 · 金基洙*
全北大學校 獸醫科大學, 裡里農高*
(1990. 11. 24 접수)

Protective influence of selenium on nitrite-induced methemoglobinemia in rabbits

Jin-sang Kim, Jeong-hee Han, Kye-soo Kim*

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Iri Agricultural High School*

(Received Nov 24, 1990)

Abstract: The protective of influences of sodium selenite (Na_2SeO_3) against the methemoglobinemia with sodium nitrite were investigated on hemoglobin, methemoglobin, glutathione peroxidase and NADH-methemoglobin reductase activity in rabbits which were given 0, 1, 3 and 9ppm sodium selenite of drinking water for a week. Dietary selenium did not alter total hemoglobin in the blood of rabbits. Selenium was found to decrease nitrite-induced methemoglobin in a dose-dependent manner. The glutathione peroxidase activity was also increased by selenium in all the experimental groups. However, the NADH-methemoglobin reductase activity by selenite did not show significant differences as concerns the methemoglobinemia. These results showed that selenium could inhibit nitrite-induced methemoglobinemia. Its influence of inhibition is suggested that the effect of the reduction of methemoglobin was greatly stimulated by glutathione peroxidase activity.

Key words: selenium, methemoglobin, glutathione peroxidase, methemoglobin reductase.

서 론

일찌기 Franke(1936)¹은 selenium이 다량 함유된 토양에서 자란 "toxic wheat"의 유해 작용을 연구하여 selenium의 동물에 대한 독성을 보고하였고 그후 Schwarz와 Foltz(1957)²가 실험 동물에서 selenium이 필수 미량원소임을 강조한 이래 많은 연구자들은 동물과 사람의 정상적 대사에 있어서 selenium의 중요성과 필수 미량원소임을 실증하였다.^{1,2,3} 최근에는 생화학적, 영양학적 및 생물학적으로 광범위하게 규명되고 있어 selenium의 생체내 기능과 과잉 노출에 따른 독성등 많은 관심을 갖게 되었다.

고농도의 selenium은 발암작용을 갖는다고 하였으나⁴

적정 수준의 selenium 급어는 간장의 괴양을 예방할 수 있고² 항암 효과가 있으며^{5,6,7} 세균 감염에 대한 면역기능 증가^{8,9}는 물론 세포성 DNA 합성 조절에 관여하고^{10,11} 수은과 몇몇 중금속 중독의 치료^{12,13}, 내분비기능^{13,14,15} 및 간 독성 예방등에 유효하다고 보고하였다.

이상에서 보는바와 같이 selenium의 생물학적, 영양학적 작용기전은 정확히 밝혀지지 않았으나 이제까지 알려진 바로는 항암 효과에 있어 selenium이 중요한 chemopreventive 물질로 작용하고⁷ 면역기능, 내분비기능, 중금속 중독 및 간독성 예방 효과등은 selenium의 항산화 작용에 기인한다고 밝히고 있다.^{16,17} Vitamin E와 함께 대표적으로 항산화 작용을 갖는 selenium은

glutathione peroxidase(GPX, glutathione, E.C. 1.11.1.9)의 구성분으로 특이한 작용을 하는 것으로 알려져 있어 그 항산화 작용이 GPX 활성으로 인하여 일어나며¹⁸ 이 GPX가 selenoprotein으로서 생물학적 기능을 갖고 각 특이표적 조직에 작용을 한다고 하였다.¹⁴ 그리고 GPX의 구성분으로서의 selenium은 체내 GPX 활성의 지표가 될만큼 심취되는 selenium과 GPX 활성간의 관계는 밀접하다.^{19,20,21} 한편 mouse²², rat²³ 그리고 sheep²⁴ 등에서 nitrite에 의한 methemoglobin(Met-Hb)형성이 selenium에 의해 억제되었고 면양에서 nitrite 처치에 의한 hypoxya가 역시 억제되었다고 보고 하였다.²⁴ Methemoglobin 환원은 주로 NADH-methemoglobin reductase에 의하여 이뤄지는데 이는 selenium이 없는 상태에서 일어난다고 한다.²⁵ 그러나 selenium에 의한 Met-Hb 환원 촉진에 GPX가 필수적이며 동물들중 GPX 활성이 높은 중일 수록 Met-Hb 환원이 빠르지만 selenium(in vitro)은 methemoglobin reductase 활성에 영향을 없다고 하였다.²⁶

이와같이 selenium이 Met-Hb 형성 억제 및 환원에 관여함은 GPX의 작용에 의하며^{23,26,28} 이 GPX는 Met-Hb 환원에 catalyst로 작용한다고 밝히고 있다.^{23,26,29} 아울러 selenium이 전자전달계에서 hepatic microsomal cytochrome p-450 system에 관여하여 cytochrome p-450 유도에 현저한 작용이 있다는 연구보고³⁰ 등으로 미뤄보아 selenium은 화학물질 대사기능에도 밀접한 관계가 있음을 알 수 있다.

저자들은 비교적 GPX 활성이 높은 rabbit에서 selenium을 농도별로 1주간 급여한 후 nitrite로 중독시켰을때 Met-Hb의 억제 효과와 이에 대한 Hb, GPX 및 NADH-methemoglobin reductase 활성치를 비교 검토하고자 실험을 시도 하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 selenium 급여 : 실험동물은 체중 2.5~3.5kg의 암수 가토를 사용하였다. 동물은 사료(삼양사)를 자유롭게 섭취하도록 하였고 각군은 sodium selenite (Na₂SeO₃, Fluka) 0, 1, 3 및 9ppm의 음수를 자유롭게 1주간 섭취하도록 하였다.

Nitrite 중독 및 혈액 채취 : 각군에 각 농도의 selenium을 1주간 급여후 phenobarbital sodium(Tokyo Kasei, 30mg/kg, I.P.)으로 마취하였고 고정후 tracheotomy를 하여 기도를 유지하고 common carotid artery에 cannula를 삽입하여 30분후에 채혈하고 sodium nitrite(50mg/kg, I.P.)로 중독시킨후 3시간 동안 30분 간격으로 채혈하여 heparin(Sigma, 600units)으로 처

리하였다.

Hemoglobin 및 methemoglobin 측정 : 채혈 직후 hemoglobin(Hb)치는 Tietz³¹에 의한 cyan-methemoglobin법에 의하여 측정하였고, Met-Hb치는 Evelyn과 Malloy³²의 방법에 의해 측정하여 총 Hb에 대하여 percentage로 나타내었다.

적혈구의 GPX 및 NADH-methemoglobin reductase 측정 : GPX 치는 Paglia와 Valentine의 분석법을 개량한 방법에 의하여 측정하여 Hb의 mg당 GPX의 units로 나타냈으며 NADH-methemoglobin reductase activity는 Hegesh와 Calmanovici³⁴ 분석법에 의하여 측정하여 Hb의 mg당 units로 나타내었다. 상기 모든 측정은 Gilford spectrophotometer와 그 recording system을 사용하였다. 얻어진 실험 성적은 nonpaired-student's t-test로 유의성을 검토하였다.

결 과

Selenium이 Hb과 Met-Hb에 미치는 영향 : 1주간 각 농도의 selenium을 급여한 결과 Hb의 변화는 없었다(Table 1). Sodium nitrite에 의한 Met-Hb 형성은 selenium을 투여하지 않은 군에서 nitrite 투여후 3시간 동안 30분 간격으로 각각 19.4±0.67, 23.76±0.78, 21.13±0.12, 16±0.64, 12.29±1.00 및 7.76±0.64%로 nitrite 투여후 1시간에 Met-Hb의 최고 농도를 나타내었고 그후 점차 회복되어 3시간 후에는 7.76%를 나타내었으나 selenium 1, 3 및 9ppm 급여군에 있어서 nitrite로 중독시키기 전에 2.60% 내지 3.02%의 Met-Hb치를 보여 대조군과 실험군간의 유의성 있는 변화는 없었으나 대조군 3.30%에 비하여 selenium 급여군의

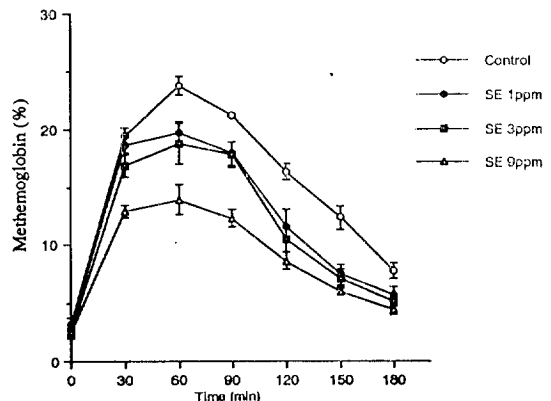


Fig 1. Influence of selenite on methemoglobinemia induced nitrite in the blood of rabbits. Each point denotes mean with S.E. from five to seven experiments. Other legends are the same as in Table 1,

Met-Hb치가 약간 낮은 경향을 보여 nitrite로 중독시키지 않은 정상 상태에서 Met-Hb에 selenium이 관여함을 추측할 수 있다.

Nitrite 중독시 형성되는 Met-Hb에 대한 selenium이 유의성 또는 고도의 유의성 있는 영향을 미칠을 알 수 있다. Fig 1에서 보는 바와 같이 selenium의 농도에 비례하여 Met-Hb 억제적 영향이 현저하게 나타났으며 특히 9ppm 급여군에 있어서 12.87 ± 0.54 , 13.9 ± 1.25 , 12.26 ± 0.72 , 8.60 ± 0.71 , 6.00 ± 0.35 및 $4.44 \pm 0.40\%$ 로 전 실험기간 동안에 걸쳐 고도의 유의성 억제 현상을 보였고 selenium 급여군은 대조군에 비하여 급속한 Met-Hb 환원 현상을 보였으며 selenium 급여군 역시 nitrite 투여후 1시간에 Met-Hb의 최고치를 나타냈다(Fig 1).

Selenium이 glutathione peroxidase에 미치는 영향 : 동물들중 GPX 활성이 비교적 높은 토끼에 selenium을 1주간 급여한 후 sodium nitrite 투여전과 후 3시간에 채혈하여 GPX 활성을 측정하였다. Nitrite 투여전 대조군의 43.84 ± 2.19 units에 비하여 selenium 급여군의 GPX 활성치는 selenium 용량에 비례하여 증가하였고 3과 9ppm 급여군은 50.30 ± 1.90 및 52.57 ± 1.33 units로 유의하게 증가하였다.

또한 nitrite 중독 3시간 후의 GPX 활성치도 중독 전과 비슷한 결과를 보여 selenium에 의한 GPX 활성치

가 nitrite 중독으로 인한 변화를 보이지 않았다(Table 1).

Selenium이 methemoglobin reductase 활성에 대한 영향 : NADH-methemoglobin reductase 반응은 실제적으로 NADH-ferricyanide reductase 활성을 나타내는데³⁵ 이 activity는 diaphorase activity와 상응하지 않으므로³⁴ 본 실험에서는 NADH-Ferrihemoglobin reductase를 측정하여 나타냈다. 1주간 각 농도별 selenium를 급여하고 nitrite를 투여하기 전, 투여후 1시간 간격으로 3시간 동안 채혈하여 reductase 활성을 측정하였다. 모든 실험군에서 nitrite 투여 전과 투여후 3시간 까지 reductase 활성의 변화를 나타내지 않아 nitrite에 의한 reductase의 증감 효과는 없었다. 또한 대조군과 selenium 급여군간의 유의성 있는 차이는 인정되지 않았으나 대조군의 3.36 ± 0.35 units에 비하여 3, 9ppm군의 reductase치가 3.70 ± 0.15 및 3.76 ± 0.26 으로 아주 정미한 증가 현상을 나타내었다(Table 2).

고 찰

Selenium은 동물에 있어서 필수적이며¹ 여러 질병의 예방을 위해 필요하다고 하였다.³⁶ 그후 생체내에 있어 미량 원소로서 그 중요성이 인식되어 selenium의 대사와 영양에 대한 연구가 급속히 증가하여 selenium이 GPX(E.C. 1. 11. 1. 9)의 주성분으로서 생물학적 기능을

Table 1. Effects of selenite on hemoglobin values and glutathione peroxidase activity in the blood of rabbits.

Group	N	Hb(g/dl)	GPX(units/mg hemoglobin)	
			0hr	3hr
Control	7	13.87 ± 0.37	43.84 ± 2.19	43.25 ± 1.95
SE 1 ppm	5	14.97 ± 0.44	44.68 ± 2.33	45.24 ± 2.47
SE 3 ppm	5	13.69 ± 0.82	$50.30 \pm 1.90^*$	$49.39 \pm 1.71^*$
SE 9 ppm	7	14.10 ± 0.51	$52.57 \pm 1.33^{**}$	$53.74 \pm 1.69^{**}$

Sodium selenite was given daily for 1 week in the drinking water. Each value represents the mean \pm SE from N number of experiments. N; Denotes the number of experiments. SE; sodium selenite. Significantly ($p < 0.01^{**}$, $p < 0.05^*$) different from control group.

Table 2. Effects of selenite on NADH-methemoglobin reductase activity(units) in the blood of rabbits.

Group	Time(hr)				
		0	1	2	3
Control		3.36 ± 0.35	3.51 ± 0.25	3.27 ± 0.27	3.29 ± 0.29
SE 1 ppm		3.48 ± 0.22	3.37 ± 0.30	3.46 ± 0.26	3.24 ± 0.24
SE 3 ppm		3.70 ± 0.15	3.59 ± 0.21	3.65 ± 0.20	3.79 ± 0.32
SE 9 ppm		3.76 ± 0.26	3.75 ± 0.24	3.91 ± 0.16	3.86 ± 0.27

Reductase was measured in rabbit blood after intraperitoneal administration of sodium nitrite at dose of 50mg/kg respectively. Other legends are the same as in Table 1.

갖는다는 것을 밝혔다.³⁷ selenium은 지역적 분포에 따라 동물의 증독 및 결핍이 보고되고^{38,39} 대부분의 음식물과 식용식물에 selenium 함유량은 토양계 selenium의 농도와 생물학적 이용도에 의하여 세계 많은 지역에서 동물과 사람이 영양학적 필요량을 위하여 적절한 selenium이 함유된 음식물과 식용식물을 생산하고 있다.

Selenium과 vitamin E의 식이 결핍에 의한 세포성 항산화 방어 기구의 손상은 동물의 질병을 낳을 수 있는데⁴⁰ 무엇보다 중요한 것은 selenium이 GPX 등의 보조인자 즉, 보결분자의 필수 성분으로 과산화수소 분해를 촉매하는 catalase로 작용한다는 것이다. 이 selenium의 기능이 구성요소이며³⁷ 각 특이 표적 조직에 작용하는 13개의 selenoprotein 중의 하나인 GPX은 동물에서 많은 생물학적 기능을 갖는다고 하였다.¹⁴ 그래서 selenium에 의한 GPX 기능은 세포내 방어기구에서 항산화의 일부를 담당하는데 이 system은 산소 재환성 등의 영향으로부터 불포화 인지질과 protein을 보호하는데 관여한다.⁴¹

이제까지 selenium의 생물학적 role은 모른다. 그러나 이는 catalysing 산화 또는 환원 효소의 필수구성분이기 때문에 다른 전자전달체에 관여할 수 있음을 시사하였고^{37,42} hepatic microsomal cytochrome p-450 system에서 phenobarbital에 의한 cytochrome p-450 증가에 selenium이 관여하므로 몇몇 효소의 필수 구성분임을 보였다.³⁰ 또한, GPX 활성은 식이 selenium의 양에 비례하며 적혈구의 산화 억제제 세포내 GPX 효소의 활성과 관련됨을 보였고⁴³ GPX 활성은 정상적으로 selenium에 노출된 지역 주민의 selenium 상태를 저적한다고 하였다.⁴⁴ 이 GPX의 구성분으로서 selenium은 단지 동물에서 selenium의 기능을 동정하였다. 그래서 혈액내 GPX 활성은 사람과 동물에서 selenium 상태의 지표로 쓰였다. 즉 동물에서 GPX 활성치는 selenium 상태를 밀접하게 반영하며^{19,20,21} rats에 급여는 결핍에 비하여 GPX 활성치가 현저하게 높다고 하였다.⁴⁵

이와 마찬가지로 본 실험에서도 각 농도별 selenium을 1주간 급여한 결과 selenium 농도에 비례하여 GPX 활성이 증가하였음을 보여주고 있어 selenium에 따라 생체내 GPX 활성이 밀접하게 관련되어 있음을 재확인 하였다. 그리고 산화제에 의한 Hb의 손상은 GPX에 의해 억제되고⁴⁶ selenium을 돼지에 1~2주 급여하면 RBC가 유의성 있게 증가된다고 하였으나⁴⁷ 본 실험 결과에서 모든 실험군의 Hb 변화를 보이지 않았다. 한편 RBC내 Met-Hb의 환원은 주로 NADH-methemoglobin reductase(NADH-ferricytochrome b₅ oxidoreductase,

E.C. 1.6.2.2)이며 selenium이 없는 상태에서 Hb로의 환원은 methemoglobin reductase에 의한다고 하였으나⁵² selenium이 H₂O₂와 ascorbic acid에 의한 Met-Hb로의 산화와 hemolysis를 억제하며³⁷ 더우기 nitrite에 의해 형성된 erythrocytes의 Met-Hb가 Hb로의 환원에 selenocompounds가 관여하는데 이 selenium에 의한 GPX가 Met-Hb 억제에 관여 된다고 하중독시 있을 때 Met-Hb가 저하되고²⁴ 기타 약품에 의한 Met-Hb 형성에 selenium의 억제적 역할이 Met-Hb의 환원에 의한 것이지 Hb의 산화를 감소시켜 일어나는 것은 아니라고 하였다.²⁷ 이처럼 selenium에 nitrite 처리 RBC에서 Met-Hb의 환원 촉진은 GPX에 의한 Met-Hb 환원에 catalysis에 의한 것이며^{23,26,29} nitrite 증독은 주로 Met-Hb 형성에 의한 혈액이 oxygen 운반 능력을 현저히 저하시켜 anemic hypoxia가 되는데 이에 의한 치사 효과에 대하여 selenium의 억제적 영향은 Met-Hb에 작용하기 때문이며²² 본 결과에서도 selenium의 농도에 비례하여 Met-Hb 형성을 현저히 억제하였고 mice에서 nitrite 투여 후 30분에 Met-Hb의 최고치를 나타냈다고 하였으나²² 본 결과에서는 nitrite 투여 후 60분에 최고치를 나타낸 점이 다르다 하겠다.

그리고 selenium에 의한 Met-Hb 환원의 촉진 정도는 적혈구 내 reduced glutathione(GSH)의 활성치에 의하여 동물의 종에 따라 selenium의 효과가 다른은 적혈구내 GSH치가 종에 따라 다르다고 하며²⁶ selenium에 의한 Met-Hb의 환원 촉진 정도는 세포내 GSH에 의한 것임을 시사하고 동물들 중 토끼의 Met-Hb 환원 촉진이 가장 높다고 한 바와²⁶ 같이 본 결과에서도 selenium 농도에 비례하며 GPX 활성치가 증가하였고 selenium 농도 및 GPX 활성에 비례하여 Met-Hb 형성이 현저하게 억제 되었음을 보았다. 아울러 selenium은 liver microsomes,⁴⁴ mitochondria⁵⁰와 같은 다른 전자전달체에 매우 중요함을 암시하여 selenium의 NADH-methemoglobin reductase에 대한 영향을 검토한 결과 대조군에 비하여 모든군에 있어서 유의성 있는 변화를 보이지는 않았으나 3 및 9ppm 급여군에 있어서는 아주 경미한 증가 현상만을 나타낸 결과를 볼 때 Met-Hb의 억제적 영향을 주로 GPX에 의한 결과라고 인정할 수 있으며 역시 rat에서 selenium(0.5~2mg/kg, s.c.) 투여 후 30분에 NADH-methemoglobin reductase 활성에 변화를 보이지 않아 Met-Hb 환원을 GPX에 의함을 보고한 바 있다. 그리고 번양에 nitrite를 투여하던 12시간 후에 Met-Hb가 정상으로 회복되는데 NADH-methemoglobin reductase는 일시적으로 약간 그 activity가 저하된다고 보고⁵¹ 하였으나 본 실험에서는 nitrite

투여 3시간 동안 그 활성치 변화를 인정할 수 없었다.

결과적으로 Met-Hb 환원에 있어 주로 GPX의 작용에 의해 일어난다고 할 수 있으나 본 실험에서 NADH-Ferrihemoglobin reductase의 경미한 변화와 selenium이 전자 전달체 및 많은 효소의 구성분으로 작용한다는 점을 고려할 때 selenium에 의해 환성화된 NADH-methemoglobin reductase에 의한 Met-Hb의 환원에 부가적 요인으로서 작용할 수 있다는 점과 GPX 및 기타 요인에 의한 Met-Hb의 환원에 대한 기전은 더욱 추구해 보아야 할 것이다.

결 론

본 연구는 selenium이 가토에서 sodium nitrite에 의한 methemoglobinemia에 미치는 영향을 규명하고자 가토에 sodium selenite 0, 1, 3 및 9ppm의 음수를 급여한 후 sodium nitrite(50mg/kg, I.P.)로 중독시킨 전, 후 Hb, Met-Hb, GPX와 NADH-methemoglobin reductase활성을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. selenium은 대조군과 각 실험군간에 있어 Hb의 변화에 영향을 미치지 않았다.

2. 전 실험군은 대조군에 비하여 selenium의 용량에 따라 nitrite에 의한 Met-Hb 형성을 현저히 억제하였다.

3. 실험군의 GPX 활성은 대조군에 비하여 selenium의 용량에 따라 증가 되었다.

4. NADH-methemoglobin reductase 활성은 대조군에 비하여 전 실험군에 있어서 유의성 있는 변화는 인정되지 않았다.

이상 실험 결과로 selenium은 가토에서 nitrite에 의한 methemoglobinemia를 억제할 수 있으며 이 억제 현상은 주로 selenium에 의해 증가된 GPX에 의하고 NADH-methemoglobin reductase에 의한 Met-Hb의 환원 효과는 아닌것 같다.

참 고 문 헌

1. Franke KW, Tully WC, Paley WE. Monstrosities produced by injection of selenium salts into hens eggs. *Anat Res* 1936;65:15~22.
2. Schwarz K, Foltz CM. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J Amer Chem* 1957;79:3292.
3. Young VR. Selenium: A case for its essentiality in man. *NEJM* 1981;304:1228~1230.
4. Medina D, Lane HW, Tracey CM. Selenium and mouse mammary tumorigenesis: an investigation

of possible mechanism. *Cancer Res* 1983;43:24605~24645.

5. Lane HW, Medina D. Mode of action of 7,12-dimethylbenzanthracene-induced mouse mammary tumorigenesis. *J Natn Cancer Inst* 1985;75:675~679.
6. Horvath PM, Ip C. Synergistic effect of vitamin E and selenium in the chemoprevention of mammary carcinogenesis in rats. *Cancer Res* 1983;43:5335~5341.
7. Medina D, Morrison DG. Current ideas on selenium as a chemopreventive agent. *Pathol Immunopathol Rev* 1988;7:187~198.
8. Teresa U, Connie J. Selenium effects on human neutrophilic granulocyte function in vitro. *Immunopharmacology* 1986;12:167~172.
9. Kiremidjian SL, Roy M, Wishe HI, et al. Selenium and immune cell function. 1. Effect on lymphocyte proliferation and production of interleukin 1 and interleukin 2. *PSEBM* 1990;193:136~142.
10. Medina D. Mechanisms of selenium inhibition of tumorigenesis. *J Am Coll Toxicol* 1986;5:21~26.
11. Frenkel GD, Walcott A, Middleton C. Inhibition of RNA and DNA polymerases by the product of the reaction of selenite with sulfhydryl compounds. *Mol Pharmacol* 1987;31:112~116.
12. Morimoto K, Iijima S, Koizumi A. Selenium prevents the induction of sister chromatid exchanges by methylmercury and mercuric chloride in human whole-blood cultures. *Mutation Res* 1982;102:183~192.
13. Gustafson A, Hedner P, Schiitz A, et al. Occupational lead exposure and pituitary function. *Int Arch Occup Health* 1989;61:277~281.
14. Behne D, Hilmert H, Scheid S, et al. Evidence for specific selenium target tissues and new biologically important selenoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1988;966:12~21.
15. Arthur JR, Morrice PC. Thyroid hormone concentrations in selenium deficient and selenium sufficient cattle. *Res Vet Sci* 1988;45:122~123.
16. Hamilton JW, Tappel AL. Lipid antioxidant activity in tissues and proteins of selenium-fed

- animals. *J Nutrition* 1963;79:498~502.
17. Shamberger RJ. Relationship of selenium to cancer I: Inhibitory effect of selenium on carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1970;44:930~936.
 18. Hoekstra WG. Biochemical function of selenium and its relation to vitamin E. *Fed Proc* 1975;34:2083~2089.
 19. Thompson RH, McMurray CH, Blanchflower WJ. The levels of selenium and glutathione peroxidase activity in blood of sheep, cows and pigs. *Res Vet Sci* 1976;20:229~231.
 20. Hoffman C, Rivinus B, Swanson L. Effect of intramuscular administration of selenium and vitamin E in dairy heifers on erythrocyte glutathione peroxidase activity and blood selenium levels. *J Anim Sci* 1978;47:192~197.
 21. Chavez ER. Effect of dietary selenium on glutathione peroxidase activity in piglets. *Can J Anim Sci* 1979;59:67~75.
 22. Masukawa T, Iwata H. Protective effect of selenite on nitrite toxicity. *Experientia* 1979;35:1360~1361.
 23. Iwata H, Masukawa T, Kasamatsu S, et al. Acceleration of methemoglobin reduction in erythrocytes by selenium. *Experientia* 1977;33:678~680.
 24. Popescu V, Vior E, Gruia V, et al. Involvement of selenium and vitamin E in the poisoning with sodium nitrite in sheep. *Lucr Inst Cerc Vet Bioprep Pasteur* 1985;17:137~150(abstract).
 25. Scott EM, Duncan IW, Ekstrand V. The reduced pyridine nucleotide dehydrogenases of human erythrocytes. *J Biol Chem* 1965;240:481.
 26. Iwata H, Masukawa T, Kasamatsu S, et al. Stimulation of methemoglobin reduction by selenium. Comparative study with erythrocytes of various animals. *Experientia* 1978;34:534~535.
 27. Iwata H, Masukawa T, Nakaya S. Effect of selenite on druginduced methemoglobinemia in rats. *Biochemical pharmacology* 1979;28:2209~2211.
 28. Beutler E, Beutler B, Matsumoto F. Glutathione peroxidase activity of inorganic selenium and seleno-DL-cysteine. *Experientia* 1975;31:769~770.
 29. Masukawa T, Iwata H. Catalytic action of selenium in the reduction of methemoglobin by glutathione. *Life Sci* 1977;21:695~700.
 30. Burk RF, Masters BSS. Some effects of selenium deficiency on the hepatic microsomal cytochrome p-450 system in the rat. *Archives of biochemistry and biophysics* 1975;170:124~131.
 31. Tietz NW. Measurement of haemoglobin concentration in whole blood. In fundamentals in clinical chemistry edited by saunders Co philadelphia 1970;411~413.
 32. Evelyn KA, Malloy HT. Microdetermination of oxyhaemoglobin a single simple of blood. *J Biol Chem* 1983;126:655~662.
 33. Black RS, Tripp MJ, Whanger PD, et al. Selenium proteins in ovine tissue III distribution of selenium and glutathione peroxidase in tissue cytosols. *Bioinorg Chem* 1978;8:161~172.
 34. Hegesh E, Calmanovici N, Avron M. New method for determining ferrihemoglobin reductase (NADH-methemoglobin reductase) in erythrocytes. *J Lab and Clin Med* 1968;72:339~344.
 35. Baker DC, Gaunt SD, Nicotinamide-adenine dinucleotide-methemoglobin reductase activity in erythrocytes from cats. *Am J Vet Res* 1985;46:1354~1355.
 36. Levander OA. In trace elements in human and animal nutrition. In: Mertz W, ed. *Academic Press Orlando* 1986;2:209~279.
 37. Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, et al. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 1973;179:588~590.
 38. Jensen LS. Precipitation of a selenium deficiency by high dietary levels of copper and zinc. *Proc Soc Exp Biol Med* 1975;149:113~116.
 39. Stevens JB, Olson WG, Kraemer R, et al. Serum selenium concentrations and glutathione peroxidase activities in cattle grazing forages of various selenium concentrations. *Am J Vet Res* 1985;46:1556~1560.
 40. Coms GFJ, Scott ML. Nutritional interrelationships of vitamin E and selenium. *Bio Sci* 1977;27:467~473.

41. Chow CK. Nutritional influences on cellular antioxidant defense systems. *Am J Clin Nutr* 1979;32:1068~1081.
42. Flohe L, Gunzler WA, Shock HH. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett* 1973;32:132~134.
43. Smith PJ, Tappel AL, Chow CK. Glutathione peroxidase activity as a function of dietary selenomethionine. *Nature* 1974;247:392~393.
44. Whanger PD, Beilstein MA, Thomson CD, et al. Blood selenium and glutathione peroxidase activity of population in Nez zealand, oregon, and south dakota. *FASEB J* 1988;2:2996~3002.
45. Hu ML, Chung C, Spallholz JE. Hematologic data of selenium-deficient and selenium-supplemented rats. *J Inorg Biochem* 1984;22:165~173.
46. Mills GC. The purification and properties of glutathione peroxidase of erythrocytes. *J Biol Chem* 1959;234:502~506.
47. Pekkanen T, Lindberg P, Sankari S. The effect of combined iron-selenium treatment on erythropoiesis and weight gain of piglets. *Acta Vet Scan* 1987;28:135~141.
48. Harvey JW, Kornick HP. Phenazopyridine toxicosis in the cat. *J Am Vet Med Assoc* 1976;169:327~331.
49. Finco DR, Duncan JR, Schall WD, et al. Acetaminophen toxicosis in the cat. *J Am Vet Med Assoc* 1975;166:469~472.
50. Tsai CS, Templeton DM, Godin JRP, et al. Comparative studies of glutathione reductase and lipoamide dehydrogenase. *Comp Biochem Physiol* 1988;90:335~339.
51. Frosli a. Methaemoglobin reduction and NADH-dependent methaemoglobin reductase activity following DNBP-and nitrite-induced methaemoglobinemia in sheep. *Acta pharmacologica et toxicologica* 1976;38:17~23(abstract).