

## 마우스에서 dibutyl phthalate 급성 투여가 간 지질과산화와 gamma-glutamyl transferase 활성에 미치는 효과

최달웅 · 김영환

고려대학교 병설 보건대학 환경보건과

### Effects of acute dibutyl phthalate administration on hepatic lipid peroxidation and gamma-glutamyl transferase activity in mice

Dal-Woong Choi, Young-Hwan Kim

Department of Environmental Health, College of Health Sciences, Korea University, Seoul, Korea

#### Abstract

Dibutyl phthalate (DBP) is used extensively in the plastic industry and has been known as an endocrine disruptor. Present study was undertaken to examine whether DBP can induce oxidative stress in mice. In this study, oxidative stress was measured in terms of the modification of lipid peroxidation and gamma-glutamyl transferase (GGT) activity. The serum toxicity index, level of lipid peroxidation and triglyceride (TG), and activity of GGT were measured in male ICR mice after a single administration of DBP (5 g/kg, po). DBP did not alter serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), creatinine, glucose and cholesterol level. However, the treatment with DBP was found to significantly increase the level of lipid peroxidation in liver and lung. The TG content and activity of GGT in the liver of DBP-exposed animals was also increased. These results indicate that DBP can induce mild oxidative stress in mice. The GGT activity is considered to be increased as one of the adaptive defense mechanisms to oxidative stress induced by DBP.

Key words : dibutyl phthalate, lipid peroxidation, gamma-glutamyl transferase, oxidative stress

#### I. 서 론

Dibutyl phthalate (DBP)는 가장 흔히 쓰이는 프탈레이트류중 하나이며, 라텍스 접착제, 플라스틱 파이프, 음식포장용기, 염료, 살충제, 향료와 화장품 등에서 가소제 또는 용제로 사용되고 있다<sup>1,2)</sup>. DBP는 유럽에서 1994 년에 약 49,000 톤이 생산되었고<sup>1)</sup>, 미국에서 1987 년에 약 11,400 톤이 생산되

었으며<sup>2)</sup>, 현재도 많은 양이 사용되고 있어 작업장 또는 일상생활 환경에서 인체는 DBP에 직간접적으로 노출될 가능성이 많다. 비직업적으로 일어나는 대부분의 DBP 노출은 DBP로 오염된 식품을 통해 이루어진다. 인간은 이렇게 환경 속에서 자기 자신도 모르게 내분비계 장애물질에 노출되어 있다. 이러한 물질은 인류의 보다 나은 생활을 위해 사용되었지만, 지금은 생명을 위협하기까지 하는

무서운 존재가 되었다. DBP는 세포를 사용한 실험에서 에스트로젠 수용체에 결합하는 것이 확인되면서 내분비계 장애물질로 추정되어 많은 관심이 집중되어 왔다<sup>34)</sup>. 임신기간 또는 수유기간 동안 실험 동물이 DBP에 노출되었을 때 그 태자에서 고환의 크기 감소와 정자의 생성 감소 등의 생식 독성이 보고 되었다<sup>5-7)</sup>. DBP는 또한 레트와 마우스와 같은 실험 동물에서 간 비대화를 유발한다<sup>8,9)</sup>. 이와 같이 DBP에 의한 생식 독성이나 간 비대화는 잘 알려져 있지만 DBP가 일으키는 산화적 스트레스에 관해서는 상대적으로 잘 알려져 있지 않다.

Gamma-glutamyl transferase (GGT)는 여러 종류의 세포의 표면에 존재하는 효소로서 대표적인 항산화제인 glutathione (GSH)의 대사에서 중요한 역할을 수행한다<sup>10)</sup>. GGT를 발현하는 세포는 세포 밖에 있는 GSH를 사용하여 세포내 GSH 합성에 중요한 원료인 시스테인을 세포내로 공급한다. 따라서 세포가 산화적 공격에 노출되었을 때 이 GGT 효소의 유도는 항산화 세포 방어 시스템에서 따라서 본 연구에서는 DBP가 산화적 스트레스를 유발함으로써 다양한 독성작용을 유발할 수 있다고 가정하고 DBP가 실험 동물에서 어느 정도의 산화적 스트레스를 유발하는가를 GGT와 같은 항산화 효소의 활성 변화와 함께 알아보았다. 이와 함께 다양한 혈중 독성 지표에 미치는 영향에 대해서도 함께 연구하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험 재료

#### 1.1 실험 동물 및 시험 물질 투여

30-40 g 응성 ICR 마우스는 샴타코(주)(오산시, 경기도)에서 구입하였다. 실험에 사용하기 전 1주일 이상 55±5%의 습도, 22±2°C의 온도 및 환기가 조절된 동물실험연구실에서 동물을 적응시켰으며 12 시간 주기로 명암을 바꾸어 주었다. 실험기간 동안 실험 동물은 자유롭게 사료와 물을 섭취하였다. 실험 동물에 DBP(Sigma Chemical Co.) 5 g/kg을 경구로 일회 투여하였다. 대조군과 처리군

은 각각 5마리의 마우스를 사용하였다. 독성물질을 투여한 후 24 시간 경과 후 혈청을 분리하여 간독성과 신장독성의 지표를 측정하고 또한 실험 동물의 간을 분리하여 지질과산화 정도와 GGT 활성 변화를 측정하였다.

### 2. 실험 방법

#### 2.1 간독성 측정

실험 동물을 에테르 마취하여 개복하고 심장으로부터 주사기로 혈액을 채취하여 5,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 얻은 상등액인 혈청에서 간독성의 지표로서 혈청 중의 alanine aminotransferase(ALT)와 aspartate aminotransferase (AST)의 활성을 측정하였다. ALT 및 AST 활성은 일반적인 Reitman과 Frankel의 방법(1957)으로 측정하였다<sup>12)</sup>. 시험관에 ALT, AST 기질액( $\alpha$ -ketoglutarate 2 mmole/l와 aspartate 200 mmole/l,  $\alpha$ -ketoglutarate 2 mmole/l와 alanine 200 mmole/l) 1 ml, 혈청 0.2 ml을 가하고 37°C에서 ALT는 30분, AST는 1시간 동안 반응시켰다. 반응 종료 후 즉시 발색액(2,4-dinitrophenyl hydrazine, 1mmole/l)을 1 ml씩 가하고 실온에서 20분간 방치한 후 0.4 N NaOH 10 ml을 가하여 증류수를 대조액으로 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. Pyruvate를 동일한 방법으로 발색시킨 표준검량선으로부터 활성을 구하였다.

#### 2.2 신장독성 측정

신장독성은 혈청 크리아티닌 농도로 Sigma diagnostic Kits 555-A를 사용하여 측정하였다. 혈청 0.15ml에 alkaline picrate solution (Creatinine color reagent containing 0.6% sodium borate and surfactant 5 volume: 1 N sodium hydroxide solution 1 volume) 1.5ml을 가하고 상온에서 10분간 방치한 후 혈청대신 물을 넣은 블랭크를 참고로 하여 500nm에서 흡광도를 측정하였다(시작 A). 위 반응액에 0.05ml의 acid 시약(sulfuric acid와 acetic acid)을 가하여 잘 섞은 후 5분간 상온에서 방치하고 500nm에서 다시 흡광도를 측정하였다(최종 A). 시작 A와 최종 A의 차이로 크리아티

년의 흡광도를 구하고 검량선으로부터 크리아티닌의 농도를 환산하였다.

### 2.3 지질과산화 측정

지질과산화는 thiobarbituric acid (TBA) 법을 이용하여 지질과산화의 최종 산물인 malondialdehyde (MDA)의 양을 측정하여 정량하였다<sup>13)</sup>. 간문맥에 생리식염수를 관류시키고 간을 적출하여 차가운 생리식염수로 씻어서 혈액을 제거하였다. 간조직 1g에 1.15% KCl 9ml을 가하고 폴리트론으로 분쇄하여 10% (w/v) 균질액을 만든 후 8.1% SDS 용액 0.2 ml, 0.67% TBA 용액 1.5ml, acetic acid(pH 3.5) 1.5ml, 증류수 0.6 ml을 취해둔 시험관에 균질액 0.2ml을 가해 마개를 막은 후 95°C의 수조에서 60분간 가열하였다. 표준검량선 작성과 블랭크의 경우는 위와 동일한 조성에 균질액 대신 tetraethoxypropane(TEPP) 희석액 또는 1.15% KCl을 동량 가하고 동일한 조작을 하였다. 찬물에 충분히 식히고 n-butanol 5ml을 가한 후 TBA 반응물을 추출하였다. 4,000rpm에서 10분간 원심분리한 후 유기층을 취해 532nm에서 흡광도를 측정하였다. 희석한 TEPP용액으로 표준검량선을 작성하여 검체에서의 MDA 생성량을 계산하고 이를 nmol/g liver으로 나타냈다. 폐에서의 지질과산화는 폐조직 전체를 사용하여 측정하였다.

### 2.4 Gamma-glutamyl transferase (GGT) 활성 측정

GGT의 활성을 측정하기 위해 적출한 간에 3 배 부피의 Tris 완충액(1mM의 EDTA, 50 mM Tris-HCl, 0.154 M KCl, pH 7.4)을 가하고 조직을 분쇄한 후 분쇄액을 시료로 사용하였다. 간의 GGT의 활성은 기질인 L-γ-glutamyl-p-nitroanilide를 가하고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 반응생성물인 p-nitroanilide를 405nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다<sup>14)</sup>. 총 반응액의 부피는 1.0ml 이었으며 0.1 M Tris buffer(pH=8.25)에서 반응시켰다. 신장의 GGT 활성은 기질을 가하여 반응을 시작하고 5 분간 흡광도 변화를 측정하였다.

### 2.5 혈중 포도당과 콜레스테롤 함량 측정

혈중 포도당과 콜레스테롤 함량은 영동제약의

포도당 측정용 시약 Glucose E Kit와 콜레스테롤 효소 시약 Cholesterol E Kit를 각각 사용하여 측정하였다.

### 2.6 Triglyceride (TG) 함량 측정

간 TG 함량은 Van Handel과 Zilversmit의 방법<sup>15)</sup>을 수정하여 측정하였다. 간 일정 부위를 잘라 67mM 인산염 완충액(pH 7.0) 4.5ml을 가해서 분쇄한 후 이 분쇄물 1ml를 클로르포름 2ml이 포함된 활성 zeolite 4g이 들어 있는 glass-stopper bottle에 가했다. 병에 클로르포름 18ml을 가하여 1시간 교반한 후 Whatman No. 2로 여과하였다. 3 개의 시험관에 여과액 0.5ml 씩 취하여 가하고 클로르포름 0.5ml을 가한 것을 블랭크로 한 후, 클로르포름을 제거하기 위해 80°C에서 30분간 가열하였다. 3개의 시험관 중에 2개의 시험관에는 alcoholic-KOH(0.4%) 0.5ml을 가하고(saponification) 나머지 하나의 시험관에는 95% alcohol 0.5ml을 가해서 (unsaponification) 65°C 에서 20분간 가온 후 0.2N 황산 0.5ml를 가해서 95°C에서 15분 동안 가온하여 남아 있는 알코올을 제거하였다. 시험관을 냉각시킨 후, 0.05M sodium metaperiodate 0.1ml를 가하여 15분간 방치한 다음 2M sodium arsenite 0.1ml를 가해 10 분간 방치하였다. 각각의 시험관에 0.2% chromotropic acid 5ml를 가해 암소에서 95°C로 30 분간 반응시킨 후 블랭크를 대조로하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다. TG함량(mg/g liver) 은 다음 공식에 의하여 산출하였다.

$$(Asu - Ausu)/(Ass - Anss) \times 0.05 \times (200/F)$$

Asu : 비누화된 검체의 흡광치

Ausu : 불비누화한 검체의 흡광치

Ass : 비누화된 표준품의 흡광치

Anss : 불비누화한 표준품의 흡광치

F : 클로르포름 추출물의 양 (ml)

### 2.7 통계처리

실험 결과를 two-tailed Student's *t*-test에 의해 분석하였다. *p* value가 0.05이하인 경우에 각 군간의 유의적인 차이가 있는 것으로 판정하였다.

### III. 결과 및 고찰

본 연구에서는 마우스를 이용하여 고농도 DBP (5g/kg, po) 단독 투여에 의해 유발될 수 있는 혈중 독성 지표와 산화적 스트레스 지표의 변화에 대하여 실험하였다. 시험 전 기간에 걸쳐 DBP 투여군에서 사망한 개체는 없었으며 외관상의 특별한 이상을 발견할 수 없었다. 먼저 첫 번째 실험으로 DBP를 투여하고 24시간 후에 혈청을 분리하여 혈중 여러 독성 지표들에 미치는 영향을 알아보았다. 간독성의 지표로 사용된 혈중 ALT와 AST 활성의 경우, DBP 투여군에서 각각  $52 \pm 9$  units/ml 와  $115 \pm 12$  units/ml, 대조군에서 각각  $46 \pm 9$  units/ml와  $105 \pm 9$  units/ml로 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다 (Student's *t*-test,  $p < 0.05$ ) (Table 1). 이는 고농도의 단독 DBP 투여가 간세포의 괴사를 일으킬 정도로 강력한 독성을 유발하지는 않음을 시사하고 있다. 또한 신장 독성의 지표로 사용된 혈중 크리아티닌의 경우에도 대조군에서  $1.12 \pm 0.05$  mg/dl, DBP 투여군에서  $1.09 \pm 0.06$  mg/dl로 유의성 있는 차이를 나타내지 않아 DBP 투여가 신장독성을 유발하지 않음을 알 수 있었다 (Student's *t*-test,  $p < 0.05$ ) (Table 1). 이외에도 당뇨병의 지표인 혈중의 포도당과 혈관 질환의 지표인 혈중 콜레스테롤 농도의 변화도 측정하였으나 DBP 투여에 의한 유의성 있는 변화를 발견할 수 없었다 (Student's *t*-test,  $p < 0.05$ ) (Table 2).

Table 1. Effects of a single administration of dibutyl phthalate (DBP) on serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and creatinine level in mice.

	Control	DBP
ALT (units/ml)	$46 \pm 9$	$52 \pm 9$
AST (units/ml)	$105 \pm 9$	$115 \pm 12$
Creatinine (mg/dl)	$1.12 \pm 0.05$	$1.09 \pm 0.06$

Each value represents the mean  $\pm$  standard deviation for five mice.

Table 2. Effects of a single administration of dibutyl phthalate (DBP) on serum glucose and cholesterol level in mice.

	Control	DBP
Glucose (mg/100ml)	$206.9 \pm 51.5$	$193.8 \pm 22.7$
Cholesterol (mg/100ml)	$162.3 \pm 14.9$	$180.4 \pm 7.3$

Each value represents the mean  $\pm$  standard deviation for five mice.

다음 실험으로 고농도 단독 DBP 투여가 산화적 손상을 유발하는 지를 알아보기 위하여 DBP 투여 24시간 후 간 조직에서 지질과산화 지표인 MDA 함량을 측정하였다. DBP 투여군의 MDA 함량은  $1190 \pm 151$  nmol/g liver로 정상 대조군의  $602 \pm 120$  nmol/g liver에 비하여 약 2 배가 유의성 있게 증가하여 DBP가 간에서 지질과산화를 유발함을 알 수 있었다 (Student's *t*-test,  $p < 0.05$ ) (Fig. 1). DBP 투여는 또한 폐에서의 지질과산화도 2.2 배 유의성 있게 증가시켰다 (Student's *t*-test,  $p < 0.05$ ) (Fig. 2). DBP가 유발하는 생식기능 이상과 간 비대화는 기존에 잘 알려져 있었으나<sup>5-9)</sup> DBP가

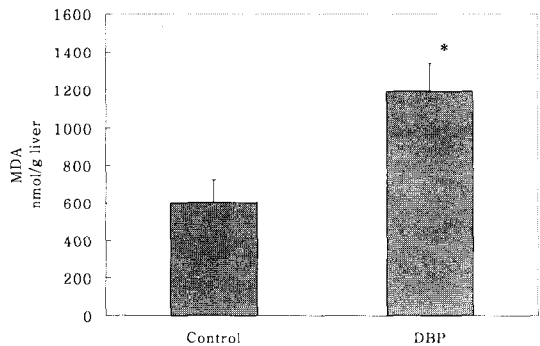


Fig. 1

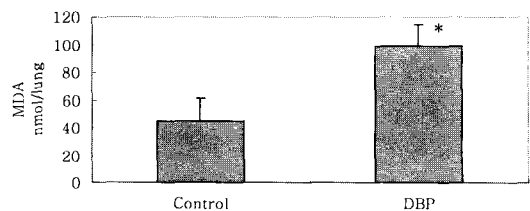


Fig. 2

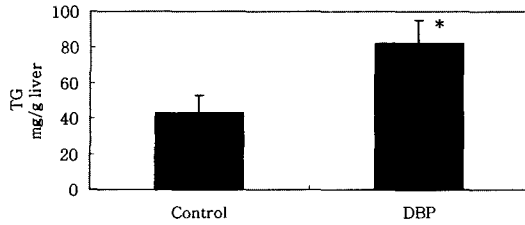


Fig. 3

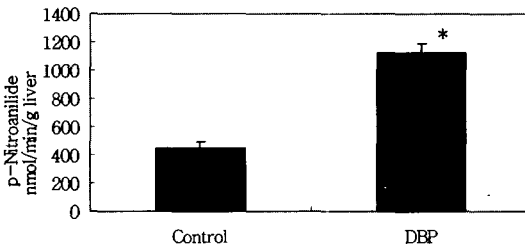


Fig. 4

유발하는 산화적 스트레스에 대해서는 상대적으로 잘 알려져 있지 않았다. 본 연구에서는 DBP 단독 투여가 마우스 간과 폐의 지질과산화물 축진시킴을 보여주었다. 본 연구에서 간 지방 산화 증가는 급성적인 간 괴사를 유발하지는 않았으나 일반적으로 지방 산화는 만성적으로 간 기능의 점진적인 저하를 유발하여 여러 가지 간질환을 유발할 수 있다. 이러한 가설을 바탕으로 DBP 투여가 간 지방대사에 미치는 영향을 알아보기 위하여 간조직에서 TG의 함량 변화를 측정하였다. 간의 TG 함량은  $43 \pm 10$  mg/g liver에서 DBP 투여에 의해  $82 \pm 13$  mg/g liver로 유의성 있게 증가하여 (Student's *t*-test,  $p < 0.05$ )(Fig. 3) 고농도 DBP는 지방간과 같은 간질환 초기 증상을 유발하는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 연구 결과는 DBP에 의한 산화적 스트레스의 증가가 여러 가지 기능 이상을 유발할 가능성을 보여주고 있다. DBP에 의한 생식 기능 이상과 간 비대화가 지속적인 산화적 스트레스의 결과인지에 대해서는 앞으로 추가 연구가 수행되어야 할 것이다.

다음 실험으로 DBP에 의해 유발된 지질과산화와 같은 산화적 스트레스가 간세포의 항산화 방어 시스템에 어떤 변화를 유발하는지를 알아보기 위해 간 GGT 활성 변화를 측정하였다. Fig. 4에서 나타난 바와 같이 DBP 단독 투여는 24 시간 후

간의 GGT 활성 ( $1120 \pm 67$  nmol/min/g liver)을 대조군의 GGT 활성 ( $445 \pm 52$  nmol/min/g liver)에 비해 약 2.5 배 유의성 있게 증가시킴을 알 수 있었다 (Student's *t*-test,  $p < 0.05$ ). 산화적 스트레스가 매우 강력하게 작용하면 세포는 사멸하게 되지만 미약하게 작용하면 세포는 살아남기 위해 그 산화적 스트레스에 대항하는 항산화 방어 시스템을 작동시킨다. 이렇게 세포가 산화적 공격에 노출되었을 때 산화적 공격에 대한 적응 반응은 세포의 생존에 있어서 매우 중요하다. 몇몇 선행 연구에서 세포가 quinone 또는 방사능과 같은 산화적 공격에 노출되었을 때 GGT 활성 증가가 보고되었다<sup>16)</sup>. GGT는 일반적으로 세포내 GSH 합성을 도와주므로, 증가된 GGT 활성은 여러 세포에서 산화적 공격에 대해 강한 저항력을 제공한다<sup>10)</sup>. GGT 활성이 큰 간세포는 GGT 활성이 낮은 간세포보다 산화적 스트레스를 유발하는 화학물질에 대해 더 강한 저항력을 가짐이 보고되었다<sup>11)</sup>. 이렇게 간의 GGT 효소는 GSH 의존 해독화 및 항산화 과정에서 중요한 역할을 하므로 간에서 이 효소의 활성증가는 어떤 산화적 자극에 대해 간세포의 방어 시스템이 가동되었다고 해석할 수 있다. 본 연구에서 GGT 활성 증가는 DBP에 의해 유발된 지질과산화와 같은 산화적 스트레스에 대항하는 항산화 방어 작용들 중 하나라고 사료된다. 따라서 DBP 급성 투여는 마우스 간에 산화적 스트레스를 유발하지만 간세포와 간 항산화 방어 시스템을 완전히 파괴시킬 정도로 강력한 산화적 스트레스를 유발하지는 않는다는 것을 알 수 있었다.

플라스틱 가소제로 쓰이는 프탈레이트류는 제품 사용시 다양한 프탈레이트류가 용출된다. 이런 점들을 고려한다면 DBP 1종만을 대상으로 한 결과는 실제 사용되는 제품에서 나타나는 결과와는 차이가 날 것으로 사료된다. 따라서 추후에는 여러 종류 프탈레이트류의 복합작용에 대한 연구가 수행되어야 할 것이다.

#### IV. 결론

내분비계 장애물질 중 하나인 DBP를 마우스에 1회 고농도 (5g/kg, po) 투여하고 24시간 후에 혈

청, 폐와 간을 분리하여 혈중 독성 지표들, 지질과산화, TG 함량과 GGT의 활성을 측정된 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 간독성의 지표인 혈중 ALT와 AST의 값은 대조군과 DBP 처리군에서 유의성 있는 차이를 보이지 않아 DBP 1회 고농도 투여는 피사성 간독성을 유발하지 않음을 알 수 있었다.
2. DBP 1회 고농도 투여는 혈중 크리아티닌, 포도당과 콜레스테롤 함량에 변화를 주지 않아 신장 독성, 당뇨병, 혈관질환 등을 유발하지 않음을 알 수 있었다.
3. 지질과산화의 지표인 MDA 함량은 DBP 처리군에서  $1190 \pm 151 \text{ nmol/g liver}$ 와  $99 \pm 15 \text{ nmol/lung}$ 으로 대조군의  $602 \pm 120 \text{ nmol/g liver}$ 와  $45 \pm 16 \text{ nmol/lung}$ 에 비해 유의성 있는 증가를 나타내어 DBP가 마우스 간과 폐에서 지방산화와 같은 산화적 스트레스를 유발시킴을 알 수 있었다.
4. TG 함량은 DBP 투여에 의해  $43 \pm 10 \text{ mg/g liver}$ 에서  $82 \pm 13 \text{ mg/g liver}$ 로 유의성 있게 증가하여 고농도 DBP는 지방간과 같은 간 지방 대사 이상을 유발하는 것을 알 수 있었다.
5. 항산화 효소인 GGT 활성은 대조군에서  $445 \pm 52 \text{ nmol/min/g liver}$ , DBP 처리군에서  $1120 \pm 67 \text{ nmol/min/g liver}$ 로 유의성 있는 차이를 나타내어 DBP 투여가 항산화 방어 효소의 활성을 증가시키는 정도의 가벼운 산화적 스트레스를 유발시킴을 알 수 있었다.

## 참 고 문 헌

1. Long, G. and Meek E : Environmental Health Criteria 189 : Di-n-butyl phthalate, World Health Organization, Geneva, 1997.
2. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR): Toxicological Profile for Di-n-butylphthalate, TP-90-10. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA., 1990.
3. Harris, C. A., Henttu, P., Parker, M. and Sumpter, J. P. : The estrogenic activity of phthalate esters in vitro, Environ. Health Perspect. 105, 802-811, 1997.
4. Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M. G. and Sumpter, J. P. : A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic, Environ. Health Perspect. 103, 582-587, 1995.
5. Foster, P. M., Cattley, R. C. and Mylchreest, E. : Effects of di-n-butyl phthalate (DBP) on male reproductive development in the rat : implications for human risk assessment, Food Chem. Toxicol. 38 (1 Suppl), S97-S99, 2000.
6. Mylchreest, E., Sar, M., Cattley, R. C. and Foster, P. M. : Disruption of androgen-regulated male reproductive development by di(n-butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide, Toxicol. Appl. Pharmacol. 156, 81-95, 1999.
7. National Toxicology Program (NTP): Final report on the reproductive toxicity of Dibutyl Phthalate (CAS No. 84-74-2) in Sprague-Dawley Rats. NYIS Publication No. PB92111996, National Technical Information Service (NTIS), US Department of Commerce, Springfield, VA, 1991.
8. Lake, B. G. : Mechanisms of hepatocarcinogenicity of peroxisome-proliferating drugs and chemicals, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 35, 483-507, 1995.
9. Reddy, J. K. and Lalwai, N. D. : Carcinogenesis by hepatic peroxisome proliferators : evaluation of the risk of hypolipidemic drugs and industrial plasticizers to humans, Crit. Rev. Toxicol. 12, 1-58, 1983.
10. Tate, S. S. and Meister, A. : Gamma-Glutamyl transpeptidase from kidney. Methods Enzymol. 113, 400-419, 1985.
11. Hanigan, M. H. and Pitot, H. C. : Gamma-glutamyl transpeptidase-its role in hepatocarcinogenesis, Carcinogenesis. 6, 165-172, 1985.

12. Reitman, S. and Frankel, S. : A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases, *Am. J. Clin. Pathol.* 28, 56-63, 1957.
13. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.* 95, 351-358, 1979.
14. Hinchman, C. A. and Ballatori, N. : Glutathione-degrading capacities of liver and kidney in different species, *Biochem. Pharmacol.* 40, 1131-1135, 1990.
15. Van Handel, E. and Zilversmit D. B. : Micromethod for the direct determination of serum triglycerides, *J. Lab. Clin. Med.* 50, 152-157, 1957.
16. Liu, R. M., Hu, H., Robison, T. W. and Forman, H. J. : Increased gamma-glutamylcysteine synthetase and gamma- glutamyl transpeptidase activities enhance resistance of rat lung epithelial L2 cells to quinone toxicity, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 14, 192-197, 1996.