

# 활성산소종으로 손상된 혈관내피세포에 대한 Vitamin E의 항산화 효과

석승한\*

원광대학교 의과대학 산본병원 신경과학교실

## Antioxidant Effect of Vitamin E on Vascular Endothelial Cells Damaged by Reactive Oxygen Species

Seung-Han Suk\*

Department of Neurology, Wonkwang University Sanbon Medical Center, Gunpo-si, Gyeonggi-do, Korea

In order to examine the injury of vascular endothelial cells related with oxidative stress of reactive oxygen species(ROS), morphological changes of vascular endothelial cells were observed by light microscope after bovine pulmonary vascular endothelial cell line (BPVEC) was treated with 15  $\mu$ M of hydrogen peroxide. In addition, the effect of vitamin E against ROS-induced oxidative stress was examined by light microscope. In this study, the cell number of BPVEC treated with ROS has significantly decreased than that of control, and the loss of cytoplasmic processes and cell swelling were observed in BPVEC treated with ROS. Whereas, cell number of BPVEC treated with vitamin E has significantly increased than that of BPVEC treated with ROS and also, cytoplasmic processes of BPVEC treated with vitamin E were preserved as control. These findings suggested that not only did ROS induce damage of BPVES by decrease of cell number, loss of cytoplasmic processes and cell swelling, but vitamin E also has protective effect against ROS-induced oxidative stress in cultures of BPVEC.

Key words : Hydrogen peroxide, BPVEC, ROS, Vitamin E

### 서 론

혈관내피세포는 뇌조직과 함께 혈관-뇌장벽(blood-brain barrier, BBB)을 형성하여 혈관내의 독성물질이나 세균과 같은 혈관내 물질이 뇌조직으로 이동하는 것을 막아줌으로서 뇌조직의 손상을 막는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>1,2,3)</sup>. 또한 혈관내피세포의 손상은 혈관내벽의 손상 및 기능이상을 초래하게 되며 그 결과 동맥경화나 혈전, 각종 혈액순환의 장애를 유발하는 병변의 형성하게 된다<sup>4)</sup>. 내피세포에서는 nitric oxide(NO)와 같은 혈관확장물질을 생산하는데 이는 혈관의 수축과 이완을 조절하여 혈류의 흐름에 관여할 뿐만 아니라 동시에 혈소판응집 억제 기능을 가지고 있어 혈관내피세포는 혈액응고기전에도 관여하고 있다<sup>1,5,6)</sup>. 따라서 혈관내피의 기능이상은

혈관이완과 수축에 대한 불균형을 비롯하여 혈액응고의 이상, 성장억제물질의 분비억제나 촉진과의 불균형을 유발하게 된다<sup>6)</sup>. 혈관내벽에 이상이 생기면 일부 cytokine은 혈관내피세포로 하여금 혈액응고의 촉진에 관여하는 물질분비를 활성화 시킨다<sup>1,8,9)</sup>. 즉, tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$ 나 interleukin(IL)-1들은 혈관내피세포를 자극하여<sup>10)</sup>, vascular adhesion molecule(VCAM)나 intracellular adhesion molecule(ICAM)과 같은 물질을 생산하게 하는데 이는 혈관벽에 백혈구와 같은 세포가 잘 붙게 하여 혈전이나 동맥경화와 같은 병변을 초래한다<sup>11,12)</sup>. 결국 혈관내피세포의 손상은 혈관내벽기능이상을 초래하게 되어 각종 혈관질환의 중요한 병인으로 작용한다<sup>1,2,13)</sup>. 따라서 내피세포의 손상을 막는 것은 동맥경화나 혈전과 같은 혈관성 질환을 예방하는데 매우 중요하다<sup>7)</sup>. 지금까지 밝혀진 혈관내피의 손상기전을 살펴보면 첫째, 세균의 내독소(endotoxin)에 의한 손상을 비롯하여<sup>3)</sup>, 둘째, 세포내 이차전달자(secondary messenger)의 활성화<sup>14)</sup>, 셋째, NO의 생성이상 넷째, 산화적 손상등이 있다<sup>5)</sup>. 세균의 내독소에

\* 교신저자 : 석승한, 경기도 군포시 산본동 1142, 원광대학교 산본병원

· E-mail : suksh@wonkwang.ac.kr · Tel : 031-390-2231

· 접수 : 2006/03/31 · 수정 : 2006/05/28 · 채택 : 2006/06/12

의한 손상은 주로 바이러스와 같은 세균에서 분비되는 독성물질에 의해 혈관내피세포가 손상되는 경우로 이는 세균에 의한 혈관내피세포의 직접적인 손상과 혈액내에 존재하는 독성에 의한 이차적인 손상이 있다<sup>13)</sup>. 세포내 이차전달자는 세포표면의 수용체와 결합되어 있기 때문에 수용체의 과자극은 protein kinase-C (PKC)나 mitogen-activated protein MAP kinase 및 phosphatidylinositol 3 (PI3)와 같은 이차전달자를 활성화 시키며 이 같은 활성화는 곧 세포의 분열이나 증식과 같은 정상적인 분화기전에 영향을 주어 비정상적인 분화나 대사과정을 유도하게 된다<sup>10,14)</sup>. 혈관내피세포는 프로스타사이클린(prostacyclin)이나 NO와 같은 혈관수축물질을 생성하는데 특히 NO의 생성과 분비에 이상이 오면 혈관의 수축기전에 이상이 생기면서 내피세포의 정상적인 대사를 방해하게 된다<sup>5,6)</sup>. 이러한 내피세포의 기능 이상은 위에 언급한 것처럼 leucocyte adhesion molecule(LCAM)을 비롯한 ICAM-1, ACAM-1의 발현을 촉진시킴으로서 결국 혈전이나 동맥경화와 같은 혈관질환을 일으키게 되는데<sup>10)</sup> 특히, 활성산소종에 의한 산화적 손상은 혈관내피세포의 기능이상을 유발하는 중요한 원인이다<sup>1,15,16)</sup>. 임상적으로 당뇨병 환자 경우 흔히 혈관내피세포에 산화적 손상을 유발시켜 그 결과 산화적 산물인 thiobarbituric reactive substance(TBARS)의 생성을 증가시키고<sup>12,17,18)</sup>, 또한 NF-κB와 같은 이차전달자의 활성화를 유도한다고 한다<sup>8,14)</sup>. 위와같은 세포내 반응은 내피세포에 이차적인 손상을 유도함으로서 결국 세포의 기능이상을 초래하게 된다. 이 밖에 활성산소종은 세포내 칼슘채널과도 밀접한 관련이 있으며<sup>19,20)</sup>, phospholipaseA2의 활성촉진에도 영향을 주어 산화적 손상에 의한 세포고사(apoptosis)를 통해 내피세포의 직접적인 사멸을 유도하기도 한다<sup>21,22)</sup>. 근래에, 동맥경화에 대한 치료적 접근의 하나로 산화적 손상으로 인한 내피세포의 기능이상을 막으므로 혈관질환을 예방하려는 여러 측면의 연구가 이루어지고 있다<sup>23)</sup>. 즉, 산화적 손상으로 인해 기능이상이 유발된 혈관내피세포에 항산화성 물질이나 활성산소제거제 등을 이용하여 혈관내피세포의 손상을 방어 내지는 회복시켜 보려는 노력이 그 것이다<sup>1,2,22,23)</sup>. 따라서 본 연구는 배양된 혈관내피세포종에 활성산소종을 처리한 후 이에 대한 vitamin E의 혈관내피세포에 대한 산화적 스트레스의 보호 효과를 형태적 변화를 통하여 확인해 보았다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약

본 실험에 사용한 Eagles' minimun essential medium(EMEM, Gibco Co)과 fetal bovine seum(FBS, Gibco Co)은 냉장 또는 냉동에 보관사용하였으며, penicillin, fungizone(Sigma Co), trypsin(Sigma, Co)은 각각 냉장보관 하였다.

### 2. 방법

#### 1) 세포배양

혈관내피세포(bovine pulmonary vascular endothelial cell line, BPVEC)의 배양은 MEM에 10% FBS와 포함된 배양액에 넣

어 세포를 부유시킨 후  $1 \times 10^5$ /well로 산정된 세포를 96-multiwell에 넣어 37°C, 5% CO<sub>2</sub>/95% air로 조절된 정온기에서 5일 동안 배양하였다. 새로운 배양액은 3일 간격으로 교환하여 주었으며 배양 완료 후 실험에 사용하였다.

#### 2) 활성산소종의 처리

배양이 완료된 세포에 활성산소종인 hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Sigma Co)를 15 uM로 6 시간 처리한 후 이의 영향을 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하지 않은 대조군과 세포형태적으로 비교 조사하였다.

#### 3) Vitamin E의 처리

배양이 완료된 세포에 vitamin E가 20 uM로 포함된 배양액에서 2시간 동안 전처리한 다음 15 uM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 포함된 배양액에서 6 시간 동안 처리한 후 이의 영향을 광학현미경 하에서 세포형태적 변화를 대조군과 비교 조사하였다.

#### 4) 광학현미경적 관찰

배양중인 세포에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 vitamin E를 동시 또는 각각 처리한 실험군을 이들을 처리하지 않은 대조군과의 형태적 변화를 조사하기 위하여 배양중인 세포를 직접 위상차현미경에 놓고 관찰하였으며 사진 촬영이 필요한 경우 현미경에 부착된 사진기로 촬영하였다.

## 결과

### 1. 대조군

활성산소종인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>나 vitamin E를 처리하지 않은 혈관내피세포는 처음에는 삼각형 모양의 세포들 이었으나 배양 시간이 경과함에 따라 점차 다각형 모양으로 변화하는 세포들이 증가하였다. 그러나 대조군에서는 수많은 삼각형 또는 다각형모양의 세포들이 배양용기바닥에 단단히 부착하여 자라고 있었으며 일부 세포들은 가늘고 기다란 세포질돌기를 내어 다른 세포들과 서로 연락하고 있었다(Fig. 1).

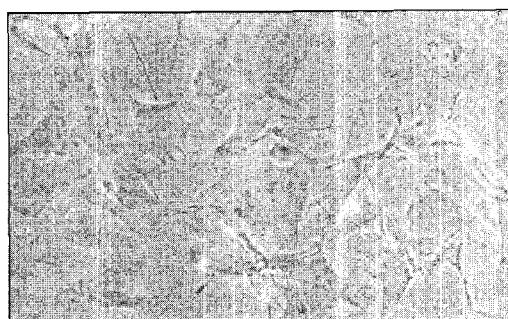
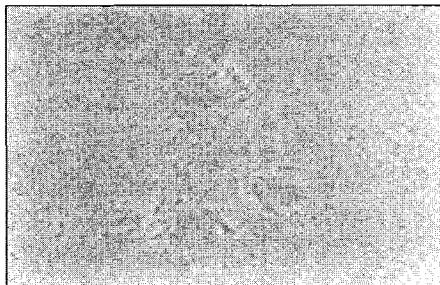


Fig. 1. The shape of vascular endothelial cells in control group were triangular at the begining of cultures, but, they were changed polyheadral according to the time-lapse. They were grown on the culture bottle firmly, and some of them were connected each other by cytoplasmic processes. x 250

### 2. 활성산소종의 처리군

활성산소종인 15 uM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 실험군에 있어서 혈관내피세포들은 대조군에 비하여 세포수가 현저히 감소되어 있었다. 또한, 세포모양도 삼각형이나 다각형에서 원형모양으로 팽창

된 변화를 보였으며 일부세포에서는 세포내 핵이 관찰되었다. 세포간을 연결하는 세포질돌기가 짧아져 있었으며 이들의 소실이 관찰이 관찰되었다(Fig. 2).



**Fig. 2.** The number of vascular endothelial cells treated with  $H_2O_2$  was more decreased than that of control. Shape of cells treated with  $H_2O_2$  were changed from triangle or polyheadral to round, and some of them were found nucleus in cells. Cytoplasmic processes of cells treated with  $H_2O_2$  were more short than those of control, and the loss of cytoplasmic processes was founded in some of them. x 250

### 3. 활성산소종과 Vitamin E의 처리군

20  $\mu M$  Vitamin E를 처리한 실험군에서 혈관내피세포들은 활성산소종인 15  $\mu M$   $H_2O_2$ 만을 처리한 실험군에 비하여 세포의 수가 현저히 증가되어 있었으며 대부분의 세포에 있어서 세포모양도 대조군에서와 같이 다각형 모양을 나타냈다. 일부세포에서는 세포질돌기의 소실도 보였으나 대조군에서와 같이 긴 세포질돌기를 내어 다른 세포들과 연결하고 있는 것이 관찰되었다(Fig. 3).



**Fig. 3.** The number of vascular endothelial cells treated with  $H_2O_2$  and vitamin E has not decreased when compared with that of vascular endothelial cells treated only with  $H_2O_2$ . Shape of cells treated with  $H_2O_2$  and vitamin E were polyheadral as control. Some of them were found to connected with each other by cytoplasmic processes as in control. x 250

## 고 찰

혈관내피세포의 손상은 동맥경화와 직접적인 관련이 있기 때문에 혈관내피세포의 손상기전을 밝히는 것은 혈관질환을 치료내지는 예방하는데 매우 중요한 의미가 있다<sup>1,7)</sup>. 최근 동맥경화의 병인의 하나로 활성산소종의 산화적 손상이 혈관내피세포의 기능변화에 의한다는 보고에 따라 이에 대한 비타민 E, 비타민 C 그리고 셀레니움 (selenium)같이 항산화 효과가 있다고 알려져 있는 약물을 이용한 항산화 치료의 임상적 접근이 시도되고 있다<sup>24,25)</sup>. 본 연구에서는 산화적 손상이 혈관내피세포에 미치는 영향을 세포의 형태변화 측면에서 조사하기 위하여 혈관내피세포

인 BPAEC를 활성산소종의 하나인 과산화수소를 세포에 처리한 결과 대조군에 비하여 현저한 세포의 수적 감소를 나타냈다. 이 같은 실험결과는 활성산소종이 세포의 항산화계를 손상시켜 항산화효소의 활성을 억제함으로서 세포의 산화적 손상을 방지하지 못했을 가능성을 배제할 수 없다<sup>17,25)</sup>. 또 다른 가능성의 하나는 활성산소종의 산화적 손상이 세포내 단백질합성이거나 DNA나 RNA와 같은 핵산물질의 합성저해 등에 의해서 세포의 분열이나 증식을 방해함으로서 세포의 수적 감소를 초래하였을 가능성이 있다<sup>26,27)</sup>. 위의 인자들과 연관하여 추론해 볼 때, 본 연구에 있어서 활성산소종만을 처리한 경우 대조군에 비하여 일부 세포에서 세포질돌기의 소실이 나타났다. 세포질돌기의 성장이나 소실은 단백질합성과 밀접한 관련이 있다는 것을 고려해 보면<sup>26)</sup>, 본 연구에서는 산화적 손상에 의하여 세포내 단백질합성계가 손상을 입어 그 결과 단백질합성효소능이 저해된 결과일 가능성이 있을 것으로 생각된다<sup>19,26,28)</sup>. 이같은 단백질합성계 손상 외에도 활성산소종의 산화적 손상은 세포내 칼슘유입을 초래하기 때문에 세포내 칼슘증가가 원인이 되어 세포의 고사를 가져왔을 경우도 가능하다<sup>29)</sup>. 이러한 근거로서 본 실험에서 활성산소종만을 처리한 실험군에서 세포의 팽창이 관찰되었다. 세포의 팽창원인은 여러 경우가 있겠으나 지금까지 밝혀진 것을 보면 세포내 칼슘의 증가와 가장 밀접한 연관이 있는 것으로 알려져 있다<sup>30)</sup>. 따라서 활성산소종에 의한 세포내 칼슘유입의 증가가 세포팽창과 같은 세포퇴화의 원인을 제공하였을 것으로 생각된다. 한편, Vitamin E는 활성산소종의 제거제로서 제시된 바 있으며 특히, vitamin E는 활성산소종인 superoxide anion ( $O_2^-$ )이나 hydroxyl radical ( $HO$ )과 결합력이 강할뿐만 아니라 비타민C인 ascorbic acid와 함께 작용하면 활성산소종의 제거능이 더욱 강해진다고 알려진 바 있다<sup>25)</sup>. 본 실험에 있어서 BPVEC에 vitamin E를 처리한 경우 세포의 수가 활성산소종만을 처리한 실험군에 비하여 매우 많았으며 세포돌기도 대조군에서와 같은 상태를 유지하고 있었다. 이 같은 본 실험의 결과는 vitamin E가 활성산소종에 의한 산화적 손상으로 부터 세포를 방어해준 결과라고 생각된다. 이는 당연히 vitamin E가 활성산소종의 산화적 손상을 제거함으로서 활성산소종으로 부터 세포내 항산화계가 손상됨을 방지하였을 결과라고 생각된다<sup>20,25)</sup>. 위에서 살펴본 바와 같이 활성산소종의 산화적 손상은 세포내 항산화계손상은 물론, 세포내 단백질합성계의 손상이나 칼슘체널의 손상등 다양한 세포대사계를 통하여 복합적으로 나타나기 때문에 이에 대한 더욱 자세한 기전을 밝히기 위해서는 세포내 신호전달체계를 비롯한 세포수용체(cell receptor) 및 단백질발현계등에 대하여 많은 연구가 체계적으로 이루어져야 할 것으로 생각된다.

## 결 론

동맥경화의 병인 하나인 혈관내피세포의 손상을 활성산소종의 산화적 손상측면에서 조사하기 위하여 혈관내피세포인 BPVEC를 배양한 후 활성산소종인 15  $\mu M$ 의 과산화수소로 배양 BPVEC를 처리한 다음 이의 영향을 광학현미경을 통하여 세포변

화를 형태적으로 관찰하였으며 동시에 vitamin E를 처리하여 활성산소종의 산화적 손상에 대한 영향을 광학현미경으로 조사하였다. 그 결과 활성산소로 처리한 실험군에 있어서 혈관내피세포는 대조군에 비하여 세포의 수가 현저하게 감소되었으며 세포질 돌기의 소실과 세포팽창과 같은 세포의 퇴화현상이 나타났다. 이에 비하여 20 uM 농도의 vitamin E를 처리한 실험군에서 혈관내피세포는 활성산소종만을 처리한 실험군에 비하여 세포의 수가 많았으며 세포질의 돌기도 대조군과 같은 상태를 나타냈다. 이상의 결과로부터 활성산소종은 혈관내피세포의 수적 감소나 세포팽창에 의해 혈관내피세포에 산화적 손상을 주었으며 vitamin E가 활성산소종으로부터 혈관내피세포가 손상되는 것을 방어하는 항산화효과를 확인 할 수 있었다.

### 감사의 말

이 논문은 2004년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨

### 참고문헌

1. Libby, P., Deanfield, J.E. A CME monograph : Atherosclerosis and vascular disease Academy for Health Education, 1-28, 2002.
2. Wautier, J.L., Zoukourian, C., Chappey, O. Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy: soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. *J Clin Invest* 97:238-243, 1996.
3. Sellke, F.M., Armstrong, M.L., Harrison, D.G. Endothelium-dependent vascular relaxation is abnormal in the coronary microcirculation of atherosclerotic primates. *Circ Res* 81:1586-1593, 1990.
4. Shimokawa, H., Vanhoutte, P.M. Dietary cod-liver oil improves endothelium-dependent responses in hypercholesterolemic and atherosclerotic porcine coronary arteries. *Circulation* 78:1421-1430, 1988.
5. Beckman, J.S., Koppenol, W.H. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite; the good, the bad and ugly. *Am J Physiol* 271:1424-1437, 1996.
6. Toda, N., Okamura, T. Role of nitric oxide in neurally induced cerebroarterial relaxation. *J Pharmacol Exp Ther* 258:1027-1032, 1991.
7. Kuo, L., Davis, M.J., Cannon, M.S. Pathophysiological consequences of atherosclerosis extend into the coronary microcirculation. Restoration of endothelium-dependent responses by L-arginine. *Cir Res* 70:465-476, 1992.
8. Mangan, D.F., Welch, G.R., Wahl, S.M. Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and IL-1 beta prevent programmed cell death (apoptosis) in human peripheral blood monocytes. *J Immunol*. 146:1541-1546, 1993.
9. Sawada, M., Kondo, N., Suzumura, A., Marunouchi, T. Production of tumor necrosis factor-alpha by microglia and astrocytes in culture. *Brain Res* 491:394-397, 1989.
10. Ganz, M.B., Saksa, B., saxena, R., Hawkins, K., Sedor, J.R. PDGF and IL-1 induce and activate specific protein kinase C isoforms in mesangial cells. *Am J Physiol* 217:F108-F113, 1996.
11. Bevilacqua, M.P. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol* 11:767-804, 1993.
12. Takahara, N., Kashiwagi, A., Nishio, Y., Harada, N., Kojima, H., Maegawa, H., Kikawa, R. Oxidized lipoproteins found in patients with NIDDM stimulate radical-induced monocyte chemoattractant protein-1 mRNA expression in cultured human endothelial cells. *Diabetologia* 662-670, 1997.
13. Harrison, D.G. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Basic Res Cardiol* 89(suppl):87-102, 1994.
14. Kapor-Drezgic, J., Zhou, X., Whiteside, C. Messandial cell PKC isoform accumulation and membrane association in high glucose(Abstract). *J Am Soc Nephrol* 8:640A, 1997.
15. Jacobson, J.M., Michael, J.R., Jafri, M.H., Gurtner, G.H. Antioxidants and antioxidant enzymes protect against pulmonary oxygen toxicity in the rabbit. *J Appl Physiol* 68:1252-1259, 1990.
16. Chuyen, N.V., Utsunomiya, N., Hodaka, A., Kato, H. Antioxidative effect of Maillard reaction products in vivo. in the "The Maillard reaction in food processing, human nutrition and physiology". ed. PA Pinot Birkhauser Verlag Basel, pp 285-290 1990.
17. Rosen, D., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O Regan, J., Deng, H., Rahmani, Z., Krizus, A. et al : Mutation in Cu /Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature (London)* 362:59-62, 1993.
18. Kim, H.S., Lee, Y.S., Oh, S.K., Lee, K.C., Lee, G.M., Lee, J., Lee, S.B., Kim, J.H., Yu, J.K., Kang, Y.S., Kim, S.S., Song, H.J., Park, S.T. Effect of Ramulus et Uncus Uncariae on Glucose Oxidase-Induced Toxicity in Cultured Cerebral Neurons. *Korean J Oriental Physiol & Pathol* 16(5):1016-1019, 2002.
19. Hayase, F., Hirashima, S., Okamoto, G., Kato, H. Scavenging of active oxygens by melanoidin. *Agric Biol Chem* 53:3383-3389, 1989.
20. Nistico, G., Ciriolo, M.R., Fiskin, D., Lannone, M., DeMartino, A., Rotilio, G. NGF restores decrease in catalase activity and increases superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity in the brain of age rat. *Free Rad Biol Med* 12:177-182, 1992.
21. Reiter, R.J. Oxidative processes and antioxidative defense mechanism in the aging brain. *FASEB J* 9:526-533, 1995.

22. Pedder, S.C., Wilcox, R.I., Johnson, D.D. Attenuation of febrile seizures in epileptic chicks by N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *Can J Physiol Pharmacol* 68:84-88, 1990.
23. Goldstein, R.H., Poliks, C.F., Pilch, P.F., Smith, B.D., Fine A. Stimulation of collagen formation by insulin and insulin-like growth factor I in cultures of human lung fibroblasts. *Endocrinology* 124(2):964-970, 1989.
24. Yamamoto, M., Scima, T., Uozumi, T., Yamada, K., Kawasaki, T. A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and protective effect of alpatocopherol administration. *Stroke* 14:977-982, 1983.
25. Cho, C.G., Kim, H.M., Park, S.T. Effect of Vitamin E on Cultured Mouse Cerebral Neurons Damaged by Oxidative stress. *Kor J Gerontol* 8(3):17-22, 1988.
26. Loft, S., Astrup, A., Buemann, B., Poulsen, H.E. Oxidative DNA damage correlates with oxygen consumption in humans. *FASEB J* 8:534-537, 1994.
27. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxic assays. *J Immunol Methods* 65:55-63, 1983.
28. Jain, S.K. Hyperglycemic can cause membrane lipidperoxidation and osmotic fragility in human red blood cells. *J Biolo Chem* 264:21340-21345, 1989.
29. Kaneko, M., Elmban, V., Dhalla, N.S. Mechanism for depression of heart sarcolemmal  $\text{Ca}^{2+}$  pump by oxygen free radicals. *Am J Physiol* 261:4948-4955, 1989.
30. Toraason, M., Breitenstein, M. Intercellular calcium transients in cardiac myocytes exposed to carbon tetrachloride (Abstract). *Toxicologyist* 11:310, 1991.