

흰쥐의 분리 간세포에서 스트렙토조토신의 독성

박기숙 · 정정철 · 문창규 · 정진호*

서울대학교 약학대학

(Received January 30, 1992)

Toxicity of Streptozotocin in Isolated Rat Hepatocytes

Ki-suk Park, Jong-Chol Chong, Chang-Kiu Moon and Jin-Ho Chung*

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract—Streptozotocin (STZ) is a naturally occurring nitrosoamide used extensively to produce diabetes in experimental animals. Our previous study has demonstrated that *i.v.* administration of streptozotocin induces significant red blood cell hemolysis in rats. Since it has been reported that the highest concentration of STZ is found in the liver, the effect of STZ in freshly isolated rat hepatocytes has been investigated. STZ treatment (10 mM) did not cause significant loss of viability throughout 4 hour incubation, while high dose of STZ (300 mM) to hepatocytes resulted in complete cell death within 3 hours. Addition of 40 mM glucose to incubation medium did not potentiate STZ-induced hepatotoxicity, suggesting that STZ-induced hyperglycemia *in vivo* did not affect its hepatotoxicity. To investigate the mechanism of the toxicity, intracellular total glutathione level was determined. Treatment with 10 mM STZ which was not toxic to hepatocytes led to complete depletion of intracellular glutathione level within 1 hour incubation. These results suggest that STZ-induced hepatotoxicity may be independent on the intracellular glutathione depletion.

Keywords □ Streptozotocin, isolated hepatocytes, hepatotoxicity, glutathione.

Streptozotocin은 *Streptomyces achromogenes* variety 128의 fermentation brothe에서 분리된 1-methyl-1-nitrosourea의 2-deoxy-D-glucose유도체로서, 광범위 항균제이며 antitumor, mutagenic, diabetogenic activity를 가지고 있다.¹⁾ 1963년 streptozotocin의 한번 투여로 흰쥐와 개에서 영구적인 당뇨병을 유발한다고 보고된 이래, 실험동물에서 당뇨병을 유발하기 위한 약물로 널리 사용된다.^{2,3)}

화학적으로 streptozotocin은 2-deoxy-2-(3-methyl 3-nitrosoureido)-D-glucopyranose이며, 구조식은 Fig. 1과 같다. 당뇨병을 유발하는 기전은 췌장의 beta cell에 대한 특이한 독성 때문이라고 알려져 있는데 streptozotocin의 nitroso기는 췌장 세포의 독성을 매개하며, deoxyglucose기는 beta cell로의 유입을 용

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

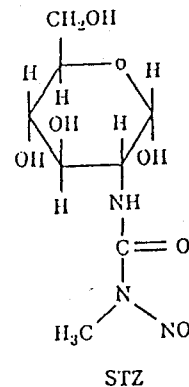


Fig. 1—Structure of streptozotocin.

이하게 한다.¹⁾ streptozotocin은 췌장 세포내 NAD 함량을 낮추는데, NAD의 전구체인 nicotinamide처럼 streptozotocin에 의해 유발되는 당뇨상태가 억

제되므로 beta cell내의 NAD감소가 세포 괴사의 주요 원인이라 추정된다.⁴⁾ streptozotocin에 의한 세포내 NAD 감소는 핵내의 poly(ADP-ribose) polymerase의 활성 증가에 의한 것으로 추정되는데, 이 경로는 세포내 NAD 대사의 주요 경로이고 이러한 작용도 nicotinamide에 의해 차단된다.⁵⁾ poly(ADP-ribose)polymerase의 활성을 증가시키는 것은 streptozotocin이 세포내에서 alkylation 및 radical attack 등을 통한 DNA 손상을 일으키기 때문이라고 알려져 있다.^{6,7)} 또한 streptozotocin은 superoxide dismutase activity를 현저히 감소시킨다.^{8,9)} 따라서 streptozotocin이 췌장에 손상을 주어 당뇨병을 유발하는 기전은 alkylation이나 radical attack으로 인한 DNA 손상 및 그로 인한 NAD depletion 등으로 추정된다.¹⁰⁾

Streptozotocin은 매우 불안정한 화합물로 알려져 있으며, 체내로 들어가면 혈중에서 빠르게 제거되며 urine으로 배설된다.¹¹⁾ isotope-labeled streptozotocin을 사용한 흰쥐의 체내 분포 상태에 관한 보고에 따르면 혈중에서는 정맥내 투여 후 10분 정도에 최대농도가 되며, 간과 신장에서는 30분에서 1시간 사이에 혈중에서 보다 더 고농도의 peak를 나타내고, 투여량의 70% 이상이 투여 후 4시간 이내에 urine으로 배설되며, 간에 가장 많이 축적된다.^{12,13)}

간은 streptozotocin이 가장 많이 분포하는 기관이며 또한 streptozotocin의 대사에도 관여하는 것으로 알려져 있지만, 간에 대한 streptozotocin의 작용에 대해서는 streptozotocin에 의해 유발된 당뇨 상태에 기인하는 대사 변화등에 관한 보고들이 많다. 실험 동물에 streptozotocin을 투여한 후 GSH S-transferase의 활성을 측정한 결과 흰쥐에서는 감소하나 생쥐에서는 증가됨이 보고되어 있다.^{14,15)} mouse의 경우 streptozotocin에 의해 유발된 당뇨 상태에 의해서가 아니라 streptozotocin자체에 의해 효소 활성이 증가되며 그 원인은 nitroso기와 관련되는 것으로 추정된다.¹⁵⁾ 그 반면에 streptozotocin에 의해 유발된 당뇨 상태에서 간의 cytochrome P-450 효소들의 활성은 기질에 따라 다양하게 변화하며, 이러한 변화는 insulin투여에 의하여 정상화되므로^{16,17)} streptozotocin의 직접 효과라기보다는 streptozotocin에 의해 유발된 당뇨상태에 기인됨을 제시하고 있다. 또한 streptozotocin에 의한 당대사의 변화로 uridine diphosphate glucuronic acid(UDPGA)가 증가되어 p-nitrophenol

의 glucuronic acid conjugation이 증가한다는 보고가 있으나,^{18,19)} glucuronyltransferase의 활성은 기질의 종류에 따라 감소하거나 변화가 없으며 membrane constraint의 증가가 감소하는 원인으로 제시된다.^{20,21)}

이처럼 streptozotocin에 의한 간대사 변화는 streptozotocin에 의한 직접효과보다는 streptozotocin을 *in vivo*로 투여함으로써 유발되는 당뇨 상태에서 야기된 이차적 효과에 초점을 맞추어 연구되어 왔다. 따라서 본 실험에서는 isolated hepatocytes system을 사용하여 streptozotocin에 의한 직접적인 간독성 및 그 작용기전을 연구하였다.

실험방법

시약 및 재료—Streptozotocin, glutathione reductase(type III) 및 collagenase(type IV)는 Sigma Chemical Co.(U.S.A)에서 구입하였으며, 세포 배양에 사용하는 배지와 시약은 cell culture tested reagent (Sigma Co.)로 사용하였다. pentobarbital은 TCI(Japan)에서 구입하였고, 2-vinyl pyridine은 Aldrich Chemical Co.(U.S.A)에서 구입하였다. 시약류는 reagent grade로 Junsei Chemical Co.(Japan)의 것을 사용하였다.

실험 동물—Female Sprague-Dawley Rat(SD rat)을 생후 3주에 유한양행에서 공급받아 본 대학 사육실에서 사육하였다. 사육조건은 온도 21±1℃, 습도 55±1%로 맞추어 주고, 12시간 주기로 명암을 바꾸어 주었으며, 사료(제일제당 사료) 및 식수는 충분히 공급하였다. 180~220 gm의 무게에서 실험에 사용하였다.

간세포 배양—흰쥐에 pentobarbital(65 mg/kg)을 복강내 주사하여 마취시킨 후 collagenase perfusion 방법을 이용하여 isolated hepatocytes를 얻었다.²²⁾ 분리시 세포 생존율은 trypan blue exclusion test로 80~89%였다. cell suspension에 25 mM-HEPES와 2%-albumin을 함유한 Krebs-Henseleit buffer(NaCl 6.9g, KCl 0.35g, KH₂PO₄ 0.16g, MgSO₄ 0.141g, CaCl₂ · 2H₂O 0.3575g, NaHCO₃ 2.1g, glucose 2g per 1l, pH 7.4)를 가하여 최종 농도 3×10⁶ cell/ml가 되도록 희석한 후 50 ml 플라스틱 erlenmeyer flask에 넣었다. 고무마개로 막은 후 95% O₂/5% CO₂의 혼합 가스를 공급하며 37% 수욕조에서 배양하였다. 이때 분

당 36회의 속도로 교반하였다. 배양시간 0, 60, 120, 180, 240분마다 배양액 500 μ 씩을 취하여 원심분리로 세포를 얻은 후 배지로 두번 세척하였다. 세척된 간세포에 EDTA 2 mM이 함유된 1 M perchloric acid 500 μ 를 가하고 vortex mixing 후 10,000g에서 2분간 원심분리하여 얻은 상등액을 취하여 glutathione 정량 시료로 사용하였다.

Glutathione 정량—Glutathione정량은 DTNB법으로,^{23,24)} 총 glutathione 측정시에는 시료 200 μ 를 취하여 우선 MOPS 0.3 mM을 함유한 2 M KOH를 가하여 pH 7 부근으로 중화시킨 후, glutathione의 농도가 20 μ M 이내에 들도록 phosphate 완충액(phosphate 0.125 M, EDTA 6.3 mM, pH 7.5)로 희석하였다. 다음 semimicro cuvette에 NADPH용액(phosphate 완충액에 NADPH를 0.3 mM이 되도록 녹인 것) 700 μ 와 DTNB용액(DTNB를 6 mM의 농도로 phosphate 완충액에 녹인 것) 100 μ , 시료 또는 glutathione표준액 200 μ 를 넣고 잘 흔들어 혼화한 후 4분간 방치하여 온도를 안정시켰다. 여기에 glutathione reductase 10 μ 를 가하고 잘 흔든 후 UV-VIS spectrophotometer에 넣고 412 nm에서 시간에 따른 흡광도를 1분간 측정하여 기울기를 구했다. glutathione표준 용액을 사용하여 검량선을 작성한 후, 이를 이용하여 시료 중에 존재하는 glutathione함량을 계산하였다. glutathione함량 단위는 GSH equivalents로서 환원형 glutathione으로 환산된 양이다.

통계 처리—통계처리는 NCSS program을 이용하였으며, two-way ANOVA test를 통하여 유의성이 확인되면 Fisher's LSD multiple range test ($p < 0.05$)를 수행하여 각 군별 유의적인 차이를 결정하였다.

실험결과

Streptozotocin을 이용한 *in vitro* 실험에서 가장 문제되는 점은 streptozotocin이 상당히 불안정하다는 사실이다. 수용액에서 쉽게 분해되지만, 아직까지 이러한 분해산물이 항암 작용이나 항균작용, 또는 당뇨를 유발할 수 있는지의 여부도 거의 알려져 있지 않다. 본 연구실에서는 cell의 존재 유무에 따른 medium내의 streptozotocin양의 변화에 차이가 없다는 점에서 간접적으로 이러한 분해가 cellular uptake에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있었고, plasma에서의

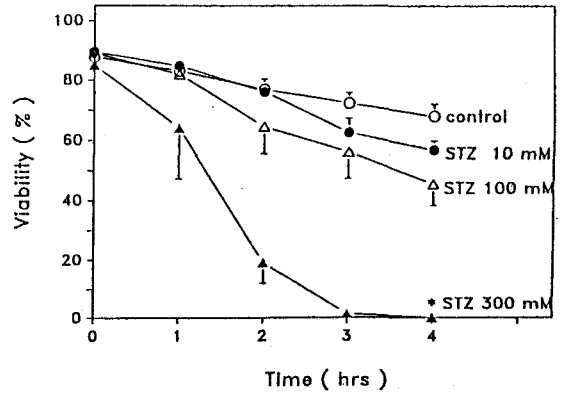


Fig. 2—Dose-dependent cytotoxicity induced by streptozotocin in isolated rat hepatocytes. Values are means \pm S.E. obtained from five separate experiments. * indicates significant differences from control (2-way ANOVA followed by Fisher's LSD test, $p < 0.05$).

분해정도가 더 크다는 점에서 본 연구의 *in vitro* buffer system이 *in vivo* 상태와 크게 다르지 않음을 보고한바 있다.²⁶⁾ 따라서 이러한 buffer system에서 streptozotocin이 세포에 미치는 영향에 대하여 실험이 가능하리라 추정하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.

Isolated hepatocyte에 streptozotocin의 용량 변화에 따른 세포 생존율에 대한 영향을 실험한 결과(Fig. 2), streptozotocin의 양이 증가함에 따라 대조군과 비교하여 생존율이 빠른 시간내에 많이 감소하였다. 이러한 생존율의 감소는 10 mM 정도의 저농도에서는 거의 나타나지 않았고, 고농도인 300 mM에서 3시간째 세포 생존율이 현저히 감소하는 것으로 나타났다.

Streptozotocin에 의한 당뇨 상태에서는 간에서 glucuronide conjugate 형성이 증가되며, 고혈당 처리시 정상쥐에서 분리한 간세포에서도 같은 효과가 나타난다.¹⁸⁾ streptozotocin에 의한 간독성도 *in vivo* 상태에서는 고혈당에 의해 변화될 수 있다. 따라서 배지에 고농도의 포도당을 녹인 후 streptozotocin의 독성이 변화되는가를 알아보았다(Fig. 3). streptozotocin을 정맥내 주사하는 경우 2시간후에 최고 40 mM까지 혈당이 증가된다는 보고가 있으므로,²⁷⁾ 대조군에서 사용한 10 mM의 포도당에 비하여 40 mM의 포도당을 사용한 고혈당 상태에서 다음 실험을 수행하였다. Fig. 3에서 고농도의 포도당은 대조군은 물론

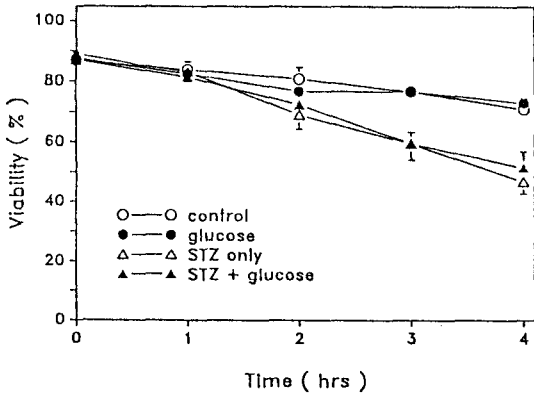


Fig. 3—Effect of hyperglycemia on streptozotocin-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. Values are representative of results obtained from four separate cell preparations.

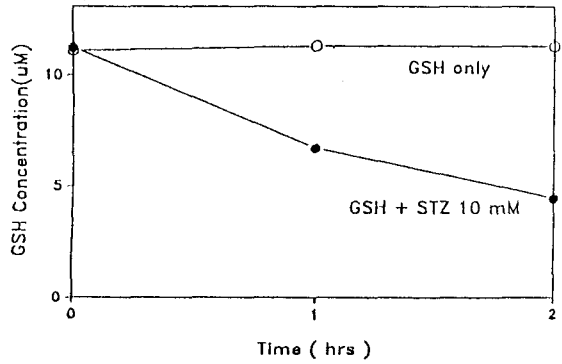


Fig. 5—Nonenzymatic binding of streptozotocin to glutathione(10 μM) in phosphate buffer. Values are representative of results obtained from three separate preparations.

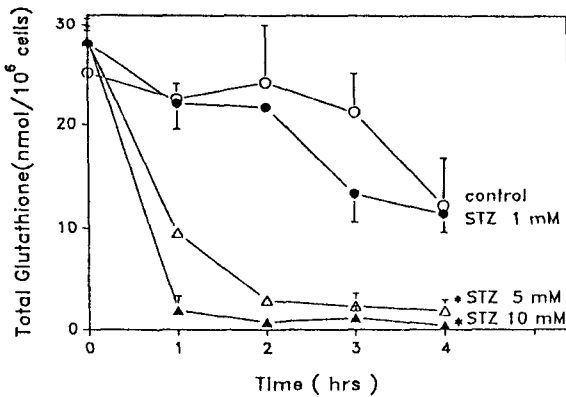


Fig. 4—Effect of streptozotocin on glutathione depletion in isolated rat hepatocytes. Values are representative of results obtained from two separate cell preparations. *indicates significant differences from control(2-way ANOVA followed by Fisher's LSD test, $p < 0.05$).

이고 streptozotocin 100 mM의 독성도 전혀 증가시키지 않았다. 따라서 streptozotocin에 의해서 야기되는 고혈당 상태가 간독성에 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있다.

일반적으로 nitrosourea계통의 화합물은 세포내 glutathione에 영향을 미쳐 간독성을 일으키는 것으로 알려져 있다.²⁸⁾ 따라서 앞서 관찰된 streptozotocin의 간세포 독성이 glutathione변화와 상관성이 있는지를 규명하기 위하여 세포내 glutathione의 변화를 알아 보았다(Fig. 4).

Streptozotocin 1 mM의 경우 대조군과 큰 차이가 없었지만, 5 mM과 10 mM에 의해 세포내 glutathione양은 배양 1시간 이내에 거의 완전히 고갈되었다. 세포내 glutathione을 완전히 고갈시킨 streptozotocin 10 mM은 세포의 생존율에는 거의 영향을 미치지 않은 농도이다. 일반적으로 세포내 glutathione 농도와 세포 독성과는 상관성이 있음이 보고되고 있으나,^{29,30)} streptozotocin의 경우 이러한 범주에 들어가지 않음을 보여주고 있다. glutathione은 산화형과 환원형으로 존재하는데 간에서의 비율은 1 : 250 정도로 환원형이 더 많이 존재한다.²⁹⁾ 이러한 비율은 화학 물질에 의한 oxidative stress를 받는 경우 감소하여 산화형 glutathione의 양이 현저히 증가하게 된다.³¹⁾ 그러나 streptozotocin은 용량변화에 따른 산화형 glutathione을 증가시키지 않음을 보여주고 있다 (data는 실지 않았음). 따라서 세포내 glutathione의 총량이 감소되는 것은 주로 conjugate 형성에 의한 것으로 생각할 수 있는데, streptozotocin이 비효소적으로 glutathione과 반응하여 conjugate를 형성할 수 있는가를 알아보기 위해 buffer에서 두 물질을 같이 반응시켰다. 실험 결과 상온에서 2시간만에 50%정도의 glutathione이 감소하는 것을 관찰하였다(Fig. 5).

세포내의 glutathione 농도와 비교하여 실험에서 사용한 glutathione양은 매우 적은 양이었으므로 streptozotocin에 의한 세포내 glutathione의 감소가 모두 비효소적 직접반응에 의한 것이라 생각할 수는 없지만, 직접적인 반응이 세포내 glutathione감소의 부분

적인 설명은 된다고 할 수 있다. 따라서 streptozotocin은 산화형 glutathione을 증가시키지 않고 glutathione conjugate를 형성하여 세포내 glutathione을 고갈시키는 것으로 생각된다. 또한 streptozotocin에 의한 glutathione의 고갈은 간세포 독성의 직접적인 원인이 되지는 않는 것으로 추정된다.

고 찰

Streptozotocin의 체내 분포 상태에 관한 실험은 여러 가지 isotope를 사용하여 수행되었으며, 1970년대에 많이 보고되었다.^{11,12)} streptozotocin[³H] isotope를 사용한 실험¹²⁾에서, 시간에 따른 autoradiogram은 정맥 투여 5분 후부터 2시간 정도까지 간에 축적되는 것을 나타내고 거의 완전히 배설되는 4시간 후에도 간에서 약하게나마 축적되는 것을 보여준다. 그러나 이러한 축적에도 불구하고 간독성에 대한 문헌 보고가 거의 없는 것을 보면, 본 연구에서 streptozotocin의 간세포 독성이 고농도에서 나타난 것은 예측 가능했던 일이다. streptozotocin은 세포독성이 아주 고농도에서 나타나므로 간독성을 심하게 일으키지는 않는 것처럼 보인다. 그러나 저농도에서 세포내 glutathione 감소를 유발하였으므로 streptozotocin 자체는 세포내 glutathione을 고갈시킬지라도 세포 독성을 심각하게 나타내지 않지만 다른 독성물질, 특히 glutathione이 해독 작용을 하는 독성 물질과 streptozotocin이 함께 노출되는 경우에는 다른 독성물질의 세포 독성을 배가시킬 수 있다.

세포내 glutathione의 동태를 살펴보면 간에서 생성된 glutathione은 간세포내에서 쓰이기도 하지만 대부분은 혈액중으로 배설되어 다른 조직으로 이동된다.²⁹⁾ 세포내의 glutathione은 glutathione peroxidase에 의해 세포내에서 생성되는 과산화수소 제거에 사용되며, 이때 생성된 산화형 glutathione(GSSG)은 glutathione reductase에 의해 NADPH를 산화시키며 glutathione으로 재생된다. 또한 glutathione S-transferase에 의해 phase II 반응에 관여하여 glutathione conjugate를 형성하기도 한다. 형성된 glutathione conjugate는 혈액을 통해 신장으로 운반되어 더 대사된 후 배설된다.²⁸⁾ electrophilicity가 큰 물질은 glutathione과 비효소적으로 반응하여 conjugate를 형성할 수도 있다. streptozotocin의 경우도 conjugate 형성

가능성이 있음을 보이고 있는데(Fig. 5), -SH group과 반응한다는 또다른 증거로 결과는 제시되지 않았으나 cysteine과 같이 incubation하는 경우에도 cysteine의 양이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. cysteine은 glutathione보다 더 많은 양이 감소하였으므로 streptozotocin에 대한 반응성이 glutathione보다는 더 높으리라 추측된다.

세포내의 환원형 glutathione과 산화형 glutathione의 비율은 세포내 단백질의 -SH group(cysteine residue)와 평형을 이루고 있으므로, 효소의 활성화에 cysteine residue가 관계하는 경우 glutathione의 redox state는 효소의 활성화에 간접적으로 영향을 미칠 수도 있다. 이러한 효소의 하나로 소포체에 존재하는 Ca²⁺-ATPase가 있다. 이 효소는 세포질의 Ca²⁺ 농도 감소에 관여하는 중요한 효소로 oxidative stress에 의해 glutathione의 비율이 감소하는 경우 이 효소가 불활성화됨과 동시에 세포질의 Ca²⁺이 증가되어 세포독성이 나타난다고 알려져 있다.^{28,29)} streptozotocin은 산화형 glutathione level에 대해서는 큰 변화를 나타내지 않았는데(data는 실지 않았음), 이에서 streptozotocin이 oxidative stress를 유발하여 세포내 산화형 glutathione을 증가시키지는 않는 것으로 보여진다. 그러나 산화형 glutathione의 농도가 실험 방법의 측정 범위보다 낮아 측정되지 않는 경우가 있었으므로 oxidative stress의 관련 여부를 판단하는 지표로 더 적합한 환원형과 산화형 glutathione의 비율은 data를 제시하지 못하였다. 따라서 다른 방법으로 streptozotocin이 oxidative stress의 관련 여부를 확인하기 위하여 산소 소비량을 측정하려 했으나 streptozotocin이 배지 중에서 분해되면서 발생하는 가스 때문에 측정에 실패하였다. 세포내에 산화형 glutathione의 양이 증가하면 세포 밖으로 유리되므로 배양액 중의 산화형 glutathione 양도 측정하였으나 이 양도 고갈되는 것으로 나타났으므로(data는 실지 않았음), streptozotocin이 산화형 glutathione은 증가시키지 않음을 확인하였다.

Streptozotocin과 같은 nitrosourea 계통의 화합물인 BCNU(N,N'-bis(2-chloroethyl)-N-nitrosourea)는 glutathione reductase를 불활성화하여 glutathione을 고갈시키는데,³²⁾ streptozotocin이 세포내 glutathione reductase에 미치는 영향을 측정하지는 않았으나 glutathione 측정에 사용한 glutathione reductase의 작

용에는 영향을 미치지 않았다.

Streptozotocin이 간세포내 glutathione에 미치는 영향에 대해서는 아직 보고된 바가 없지만, DNA 손상 물질로서 poly(ADP ribose) polymerase를 활성화시켜 세포내 NAD 함량을 낮춘다고 보고되어 있다.^{33,34)} 세포내 NAD와 glutathione의 동태 사이의 연관 관계는 구체적으로 알려져 있지 않으나, glutathione의 산화형과 환원형의 비율에 관계하는 NADPH가 NAD와 관련될 수 있으므로 streptozotocin에 의해 glutathione이 고갈되는 구체적 원인과 이러한 glutathione의 고갈이 세포생존율에는 영향을 미치지 않는 이유를 streptozotocin에 의해 일어나는 다른 세포내의 변화와 연관시킬 수 있다면, 세포 괴사의 또다른 기전을 제시할 수 있을 것이다.

결 론

Isolated rat hepatocytes system을 이용하여 streptozotocin의 독성을 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. (1) streptozotocin은 고농도인 300 mM에서 간세포의 생존율을 감소시켰으며, (2) 고혈당 상태는 streptozotocin에 의한 세포독성에 영향을 미치지 않았고, (3) 세포내 glutathione은 간세포의 생존율에 영향을 미치지 않는 저농도인 10 mM의 streptozotocin에 의해 크게 감소하였으나, 산화형 glutathione에는 영향을 미치지 않았고, (4) streptozotocin과 glutathione은 비효소적으로 결합하여 glutathione을 고갈시켰다. 따라서 streptozotocin은 세포내 glutathione의 감소가 간세포 독성 기전에서 주요 현상이 아님을 알 수 있고, streptozotocin에 의한 간세포내 glutathione의 감소는 oxidative stress에 의하지 않고 비효소적으로 glutathione conjugate를 형성하기 때문임을 제시하고 있다.

감사의 말씀

본 연구는 1991년도 한국과학재단 목적기초연구비에 의해 이루어졌습니다.

문 헌

1) Weiss, R.W.: Streptozotocin: Review of its phar-

macology, efficacy and toxicity. *Cancer Treat. Rep.*, **66**, 427(1982).

- 2) Junod, A. and Lambert, A.E.: Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.*, **126**, 201(1967).
- 3) Past, M.R. and Cook, D.E.: Effect of diabetes on rat liver cytochrome P-450. *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 3329(1982).
- 4) Duljin, W.E. and Wyse, B.M.: Studies on the ability of compounds to block the diabetogenic activity of streptozotocin. *Diabetes* **18**, 459 (1969).
- 5) Anderson, T., Schein, P.S., McMenamin, M.G. and Cooney, D.A.: Streptozotocin diabetes-correlation with extent of depression of pancreatic islet NAD. *J. Clin. Invest.*, **54**, 672(1974).
- 6) Gunnarsson, R., Berne, C. and Hellerstrom, C.: Cytotoxic effects of streptozotocin and N-nitrosomethylurea on the pancreatic B cells with special regard to the role of NAD. *Biochem. J.*, **140**, 487 (1974).
- 7) Yamamoto, H., Uchigata, Y. and Okamoto, H.: Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature* **294**, 284(1981).
- 8) Wilson, G.L. et al.: Mechanism of streptozotocin and alloxan induced damage in rat β -cells. *Diabetologia* **27**, 587(1984).
- 9) Wilson, G.L., Hartig, P.C., Patton, N.J. and LeDoux, S.P.: Mechanisms of poly(ADP-ribose) synthetase and cellular distribution. *Diabetes* **37**, 213(1988).
- 10) Papaccio, G., Pisanti, F.A. and Frascatore, S.: Acetyl-homocysteine-thiolactone-induced increase of superoxid dismutase counteracts the effect of subdiabetogenic doses of streptozotocin. *Diabetes* **35**, 470(1986).
- 11) Bhuyan, B.K., Kuentzel, S.L., Graey, L.G., Fraser, T.J., Wallach, D. and Neil, G.L.: Tissue distribution of streptozotocin(NSC-85998). *Cancer Chemother. Rep.*, **58**, 157(1974).
- 12) Karunanayake, E.H., Hearse, D.J. and Mellows, G.: The synthesis of [¹⁴C]streptozotocin and its distribution and excretion in the rat. *Biochem. J.*, **142**, 673(1974).
- 13) Karunanayake, E.H., Hearse, D.J. and Mellows, G.:

- The metabolic fate and elimination of streptozotocin. *Biochem. Soc. Trans.*, **3**, 410(1975).
- 14) Agius, C. and Gidari, A.S.: Effect of streptozotocin on the glutathione S-transferase of mouse liver cytosol. *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 811(1985).
 - 15) Rouer, E., Mahu, J.L., Dansette, P. and Leroux, J.P.: UDP-glucuronosultransferase, epoxide hydrolase and glutathione S-transferase activities in the liver of diabetic mice. *Biochem. Biophys. Acta* **676**, 274(1981).
 - 16) Yamazoe, Y., Murayama, N., Shimada, M., Yamachi, K. and Kato, R.: Cytochrome P450 in livers of diabetic rats: regulation by growth hormone and insulin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **268**, 567(1989).
 - 17) Barnett, C.R., Gibson, G.G., Wolf, R., Flatt, P.R. and Ioannides, C.: Induction of cytochrome P450III and P450IV family proteins in streptozotocin-induced diabetes. *Biochem. J.*, **268**, 765(1990).
 - 18) Eacho, P.I., Sweeny, D. and Weiner, M.: Effects of glucose and fructose on conjugation of p-nitrophenol in hepatocytes of normal and streptozotocin-diabetic rats. *Biochem. Pharmacol.*, **30**, 2616(1981).
 - 19) Eacho, P.I., Sweeny, D. and Weiner, M.: Conjugation of p-nitroanisole and p-nitrophenol in hepatocytes isolated from streptozotocin diabetic rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **218**, 34(1981).
 - 20) Morrison, M.H. and Hawksworth, G.M.: Glucuronic acid conjugation by hepatic microsoma fractions isolated from streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 3833(1984).
 - 21) Grant, M.H. and Duthie, S.J.: Conjugation reaction in hepatocytes isolated from streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 3647(1987).
 - 22) Leffert, H.L., Koch, K.S., Moran, T. and Williams M.: Liver cells. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press, N.Y., Vol. 58, pp. 536-544(1979).
 - 23) Akerboom, T.P.M. and Sies, H.: Assay of glutathione and glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. In: Fleischer, S. and Packer, L.(eds.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, N.Y., Vol. 77, p. 373(1981).
 - 24) Griffith, O.W.: Glutathione and glutathione disulfide. In: *Methods in Enzymatic Analysis*. Vol. 8, p. 521(1985).
 - 25) Griffith, O.W.: Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.*, **106**, 207(1980).
 - 26) Park, K.S., Ho, J.S., Moon, C.K. and Chung, J.H.: Spontaneous degradation and cellular uptake of streptozotocin in two different buffer systems. in press.
 - 27) Macfariane, M. and Skett, P.: Time course of the effect of streptozotocin on serum concentration of glucose and triglycerides and on hepatic drug metabolism in the male rat. *Acta Encocrin.*, **112**, 300(1986).
 - 28) Reed, D.J.: Nitrosoureas. In: Sies, H.(eds.), *Oxidative Stress*. Academic Press, London, p. 115(1985).
 - 29) Kaplowitz, N., Aw, T.Y. and Ookhtens, M.: The regulation of hepatic glutathione. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **25**, 715(1985).
 - 30) Monte, D.D., Bellomo, G., Thor, H., Nicotera, P. and Orrenius, S.: Menadione-induced cytotoxicity is associated with protein thiol oxidation and alteration in intracellular Ca²⁺ homeostasis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **235**, 343(1984).
 - 31) Thor, H., Smith, M.T., Hartzell, P., Bellomo, G., Jewell, S.A. and Orrenius, S.: The metabolism of menadione(2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. *J. Biol. Chem.*, **257**, 12419(1982).
 - 32) Smith, P.F., Alberts, D.W. and Rush, G.F.: Role of glutathione reductase during menadione-induced NADPH oxidation in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 3879(1987).
 - 33) Schein, P.S. and Loftus, S.: Streptozotocin: depression of mouse liver pyridine nucleotides. *Cancer Res.*, **28**, 1501(1968).
 - 34) Schein, P.S., Cooney, D.A., McMeamin, M.G. and Anderson, T.: Streptozotocin diabetes-further studies on the mechanism of depression of NAD concentrations in mouse pancreatic islets and liver. *Biochem. Pharmacol.*, **22**, 2625(1973).