

## Metallothionein이 지질과산화반응과 Aldehyde Oxidase활성에 미치는 영향

허근\* · 신억섭 · 박종민\*\*

영남대학교 약학대학, \*\*영남대학교 의료원 약제부

### Effect of Metallothionein on the Lipid Peroxidation and Aldehyde Oxidase Activity

Keun Huh\*, Uk Seob Shin and Jong Min Park\*\*

Department of Pharmacology and Toxicology, College of Pharmacy,  
Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

\*\*Department of pharmacy, Yeungnam medical Center, Taegu 705-035, Korea

(Received April 1, 1995)

(Accepted April 12, 1995)

**ABSTRACT :** The effects of metallothionein and cadmium ion on the hepatic aldehyde oxidase activity and brain lipid peroxidation were tested *in vitro*. The content of brain lipid peroxide at the condition of normal or 300  $\mu$ M Fe(II)-induced was remarkably reduced by the addition of metallothionein in the incubation mixture. The induced content of lipid peroxide by cadmium (30  $\mu$ g/ml) ion was reduced by metallothionein (100  $\mu$ g/ml). The activity of aldehyde oxidase was not affected by metallothionein, but cadmium ion (8.38  $\mu$ g/ml) increased the activity of aldehyde oxidase about 80% compared to the control. The cadmium-induced activity of aldehyde oxidase was restored to the control level by metallothionein or penicillamine.

**Key Words :** Metallothionein, Cadmium ion, Lipid peroxidation, Aldehyde oxidase

### I. 서 론

Metallothionein은 1957년 Margoshes에 의해서 말의 신장조직으로부터 발견되어진 금속단백질로 61개의 아미노산으로 구성되어 있으나 방향족 아미노산은 함유되어 있지 않고 cystein이 약 30%에 해당되는 20개를 갖고 있는 특성을 지니고 있다(Margoshes, 1957; Hamer, 1986; Bremner, 1987; Kagi *et al.*, 1990). Metallothionein은 cadmium이나 mercury와 같은 중금속류들에 의해 생체내에서 생성이 촉진(Onosaka and Cherian, 1981; Wake and Mercer, 1985)되어 지므로 이들 중금속의 독성을 해독하는 생체방어 기구에 관여하고 있을 것으로 예상되나 그 작용기전에 대해서는 명확하게 밝혀져 있지 않고 있다. 최근 여러 연구진에 의하여 metallothionein의 생합성 증가현상은 중금속 뿐만이 아니라 많은 종류의 xenobiotics들에 의해서도 생합성이 유도되어지고 있음이 확인(Kotsonis and Klaassen, 1979; Wo-

msler and Calp, 1987; Min *et al.*, 1991)되어 metallothionein은 중금속류들의 해독 뿐만 아니라 광범위한 독성물질들로 부터 생체를 보호하는 반응에 기여하고 있을 것으로 생각되어 지고 있다.

활성산소종은 생명현상을 유지하는 과정에서 호흡현상으로 공기중의 산소가 생체내로 흡입되어 일련의 생화학반응이 이루어질때 전자를 획득하므로써 생성되어지는 물질이다(McCord and Fridovich, 1978). 외부에서 생체내로 들어간 외인성물질이나 내인성 생체성분을 산화시키는 생화학적 산화반응이 진행되는 과정중에 산소분자를 전자수용체로 활용하는 경우 활성산소종이 생성된다(Kleinsky *et al.*, 1974). 활성산소종은 강력한 산화반응을 지니고 있어 조직손상을 야기시키기 때문에 많은 종류의 난치성 질환을 일으키는 병원성 인자로 지목되어 지고 있다(McCord and Roys, 1982). 뿐만 아니라 많은 종류의 독성물질들이 독성을 일으키는 과정에도 활성산소종을 개입하고 있음이 보고(Darr and Fridovich, 1984)되어 관심을 갖게하고 있다. 본 연구에서는 metallothionein의 생체방어작용 기전을 과산화지질의 생성

\*To whom all correspondences should be address

및 활성산소 생성효소인 aldehyde oxidase의 활성변화와 관련시켜 검토코자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시약 및 동물

Metallothionein, bovine serum albumin(BSA), nicotine adenine dinucleotide(NAD<sup>+</sup>), N-methylnicotinamide(NMN), thiobarbituric acid (TBA) sodium salt, xanthine oxidase 및 xanthine sodium salt는 Sigma사로부터 구입한 제품을 사용하였고 기타 시약은 특급품 또는 일급품을 사용하였다. 실험에 사용한 동물은 본 대학 동물사에서 오전 7시에 점등되고 오후 7시에 소등되며 실내 온도가 22°C로 유지되는 일정한 조건으로 사육한, 외관상 건강한 250 g내외의 웅성 rat를 사용하였다.

### 2. 효소원의 조제

동물을 단두 도살한 다음 복부 및 두개골을 절개하여 간 및 뇌 조직을 적출하고 0.9% 생리식염수로 씻은 다음, 조직 1 g당 4배량의 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5, 이하 K.P. buffer 로 약함)를 가하여 빙냉하에서 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 각 마쇄균질액을 600×g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄부분을 제거한 상징액을 얻었다. 이것을 다시 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 mitochondrial fraction 을 제거시킨 상징액을 얻고, 이 상징액을 105,000×g에서 1시간 동안 초원심분리하여 얻은 cytosolic fraction을 aldehyde oxidase활성측정의 효소원으로 사용하였다.

### 3. 효소활성의 측정

#### 1) Aldehyde oxidase활성 측정

Aldehyde oxidase활성은 Rajagopalan 등(1962)의 방법에 의해 0.1M K.P. buffer(pH 7.5) 일정량에 기질인 N-methylnicotinamide 1.5 mM과 효소액을 첨가해 37°C에서 20분간 반응시킨 뒤 20% TCA를 가해 반응을 종료시켰다. 반응 종료후 생성된 pyridone을 파장 300 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 효소의 활성도를 산정하였다. 효소의 활성도는 1분당 1 mg의 단백질이 생성시킨 pyridone의 양을 nmole로 나타내었다.

#### 4. 2-pyridone(N-methyl-2-pyridone-5-carboxylic acid amide)의 합성 및 확인

Hollman 등(1948)의 방법에 따라 nicotinic acid를 출발물질로 하여 methyl sulfate와 potassium ferricyanide 및 염산을 처리하여 N-methyl-2-pyridone-5-carboxylic acid를 합성한 다음 이것을 thionyl chloride와 같이 서서히 가온하여 끓인다음 과량의 thionyl chloride를 제거하고 감압농축하여 N-methyl-2-pyridone-5-carboxylic acid amide를 합성하였다. 이것을 재결정하여 원소분석으로 확인하고 실험에 사용하였다.

### 5. 과산화지질 함량측정

과산화지질 함량 측정은 Ohkawa 등(1979)의 방법을 약간 변경하여 조직 마쇄 균질액 일정량에 xanthine-xanthine oxidase system을 첨가하여 37°C에서 60분간 반응시킨 다음, 8.1% sodium dodecyl sulfate(SDS), 20% acetate buffer(pH 3.5) 및 0.8% TBA 용액을 가해 95°C에서 1시간 동안 반응시켰을 때 생성되는 홍색의 TBA reactive substance를 n-butanol:pyridine(15:1)의 혼액으로 이행시켜 파장 532 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 정량하였다. 과산화지질의 함량은 조직 1 g당 MDA량을 nmole로 나타내었다.

### 6. 단백질의 정량

단백질의 정량은 Lowry 등(1951)의 방법에 준해 bovine serum albumin을 표준품으로 이용하여 실시하였다.

## III. 결 과

### 1. 뇌 조직의 과산화지질 생성에 미치는 metallothionein의 영향

생체를 구성하고 있는 조직중에서 제일 많은 수의 세포 분포와 인지질 함량이 가장 많은 뇌조직의 homogenate를 시료로 하여 과산화지질의 생성반응에 미치는 me-tallothionein의 영향을 관찰하였다(Fig. 1). 뇌조직의 과산화지질 생성은 metallothionein의 첨가 농도 의존적으로 억제되었으며 100 µg/ml 농도에서는 30% 정도의 현저한 억제 효과가 관찰되었다. 일반적으로 철이온은 불포화 지방산의 과산화반응을 촉진시키는 금속으로 널리 알려져(Motahashi and Mori, 1983)있으므로 과산화지질 생성 반응액 중에 철이온을 첨가하고 과산화지질의 생성량을 측정하였을 때 철이온 300 µM 농도에서는 약 1.5배 정도의 과산화지질 생성이 증가하였다. 또 반응액 중에 철이온과 metallothionein을 함께 첨가한 실험조건

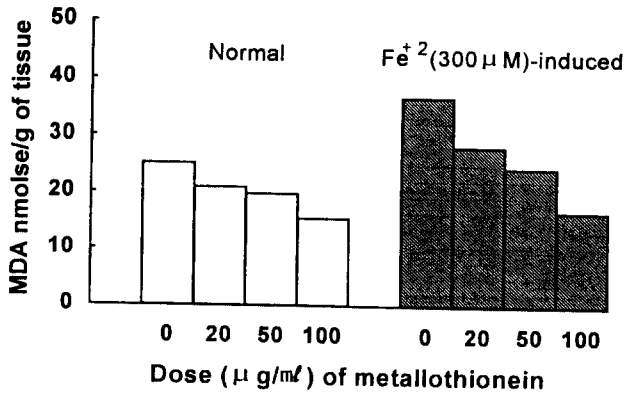


Fig. 1. Effect of metallothionein on the brain lipid peroxidation *in vitro*. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean for 3 separate experiments.

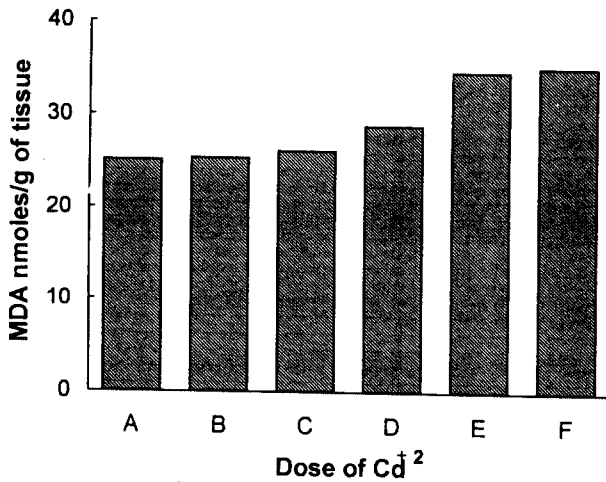


Fig. 2. Effect of Cd<sup>2+</sup> on the brain lipid peroxidation *in vitro*. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean for 3 separate experiments. A: control, B: 3.35 µg/ml, C: 6.7 µg/ml, D: 13.4 µg/ml, E: 33.5 µg/ml, F: 67 µg/ml of incubation mixture.

에서는 철이온 단독 첨가한 실험치보다 과산화지질의 생성량이 약 절반 가까이 감소됨을 관찰할 수 있었다. 이것으로 보아 metallothionein의 과산화지질 생성 억제 작용은 비정상적으로 증가되는 지질과산화 반응에 보다 더 효율적으로 억제 작용을 나타내고 있을 것으로 예상 되어진다.

### 2. Cadmium이온이 증가시키는 뇌 조직 과산화지질 생성 반응에 미치는 metallothionein의 영향

Metallothionein은 xenobiotics에 대한 생체방어 물질로서 cadmium에 의해서 가장 강력하게 생합성이 유도 되어진다고 알려져 있다(Onosaka and Cherian, 1981). Metallothionein의 항산화작용을 cadmium의 독성과 연

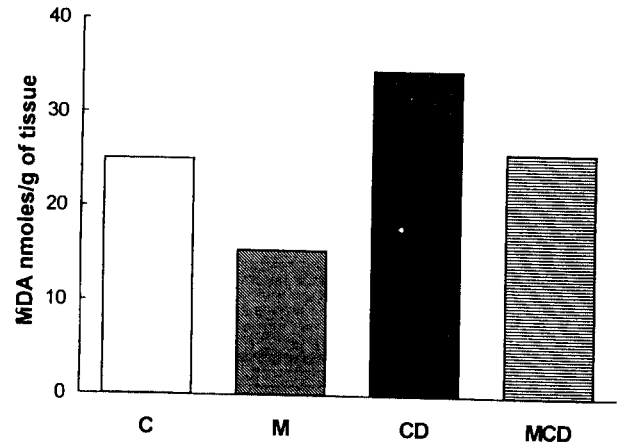


Fig. 3. Effect of metallothionein on the Cd<sup>2+</sup>-induced brain lipid peroxidation *in vitro*. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean for 3 separate experiments. C: control, M: metallothionein (100 µg/ml), CD: Cd<sup>2+</sup> (3.35 µg/ml), MCD: metallothionein+Cd<sup>2+</sup>

관지어 검토하는 방법의 하나로 cadmium이 뇌조직의 지질과산화반응에 어떤 영향을 주는지 비교 관찰하였다. 뇌조직 homogenate와 cadmium을 농도별로 반응액 중에 첨가시키고 과산화지질의 생성을 측정하였을 때 cadmium이온의 첨가농도 의존적으로 과산화지질의 생성을 증가시켰으며 특히 첨가량이 30 µg/ml 농도에서는 대조치보다 약 30% 정도 과산화지질의 생성을 증가 시킴이 관찰되었다(Fig. 2). 한편 이와 같이 cadmium에 의해서 증가된 지질의 과산화반응에 metallothionein이 어떤 영향을 미치는 지를 검토하였을 때 cadmium에 의해서 현저히 증가되던 과산화지질의 생성량이 metallothionein을 공존시킨 조건에서는 cadmium 단독첨가군에 비해 과산화지질의 생성이 억제됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

### 3. Aldehyde oxidase활성에 미치는 cadmium이온의 영향

Aldehyde oxidase는 세포질 분획에 존재하며 aldehyde류를 비롯한 nitrogen heterocyclics종류의 여러가지 물질들의 산화반응을 촉매하는 효소(Wolpert *et al.*, 1973)로 활성산소종을 생성하여 지질의 과산화반응에 관여하고 있으므로 aldehyde oxidase 활성에 미치는 cadmium 이온의 영향을 관찰하였다(Fig. 4). Aldehyde oxidase 활성측정 반응액중에 cadmium이온의 첨가농도를 점차적으로 증가시켜 16.8 µg/ml 농도까지 되게 하면서 aldehyde oxidase활성변화를 관찰하였을 때 cadmium 1.68 µg/ml 농도에서는 약 5%, 6.70 µg/ml 에서는 약 30%, 16.8 µg/ml 농도에서는 거의 2배 가까이 효소

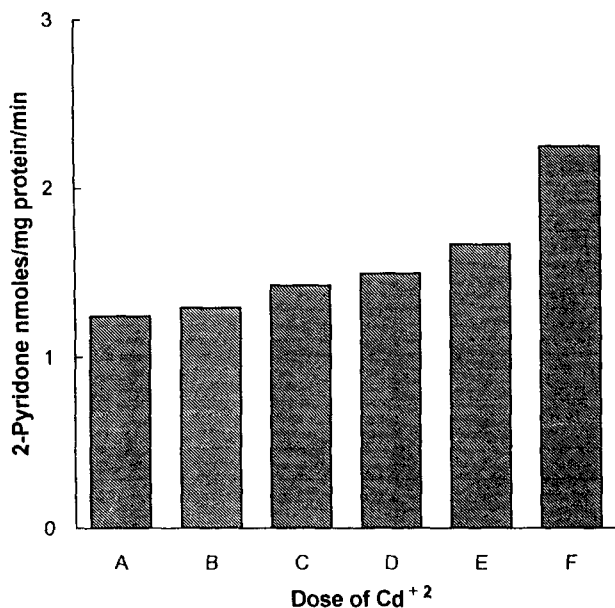


Fig. 4. Effect of Cd<sup>2+</sup> on the hepatic aldehyde oxidase activity *in vitro*. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean for 3 separate experiments. A: control, B: 0.67 µg/ml, C: 1.68 µg/ml, D: 3.35 µg/ml, E: 6.70 µg/ml, F: 16.8 µg/ml of incubation mixture.

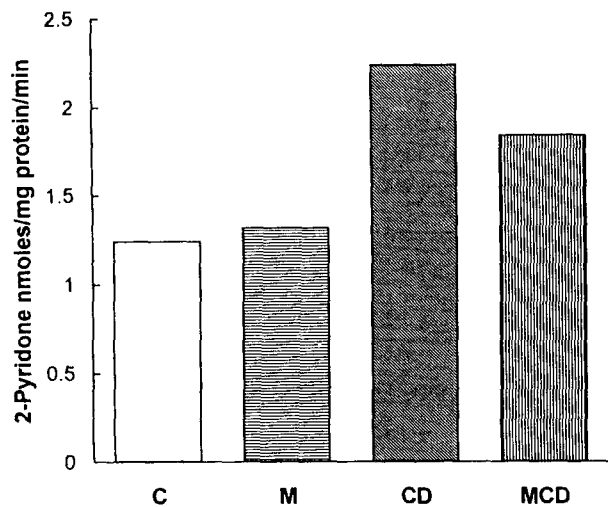


Fig. 5. Effect of metallothionein on the Cd<sup>2+</sup>-induced aldehyde oxidase activity *in vitro*. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean for 3 separate experiments. C: control, M: metallothionein (100 µg/ml), CD: Cd<sup>2+</sup> (16.8 µg/ml), MCD: metallothionein+Cd<sup>2+</sup>.

활성 증가현상이 나타났다.

#### 4. Cadmium이온이 유도한 aldehyde oxidase 활성에 미치는 metallothionein의 영향

Aldehyde oxidase 활성측정 반응액 중에 cadmium이

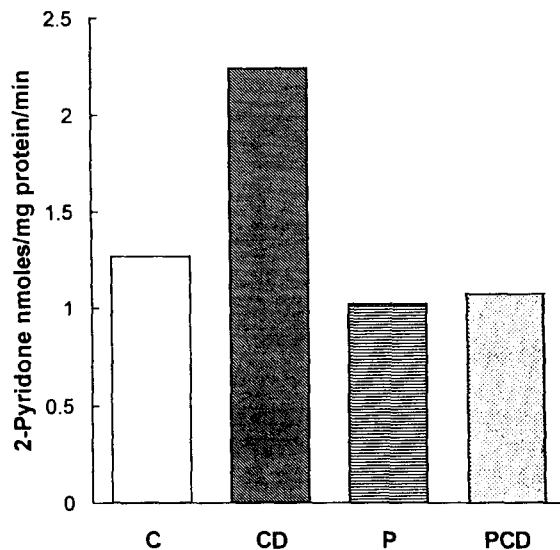


Fig. 6. Effect of penicillamine on the Cd<sup>2+</sup>-induced hepatic aldehyde oxidase activity *in vitro*. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean for 3 separate experiments. C: control, CD: Cd<sup>2+</sup>(16.8 µg/ml), P: penicillamine(10 mM), PCD: Cd<sup>2+</sup> + penicillamine

온을 첨가하여 효소활성을 증가시킨 상태에서 metallothionein이 어떤 영향을 주는가를 관찰하였다(Fig. 5). Aldehyde oxidase 활성측정 반응액중에 cadmium이온의 농도를 16.8 µg/ml로 첨가하면 효소활성은 대조치가 1.24 nmoles/mg protein/min인데 비해 cadmium이온(16.8 µg/ml)을 첨가하면 효소활성이 2.24 nmoles/mg protein/min으로서 대조치에 비해 약 2배 정도의 활성증가현상이 관찰되었다. 한편 효소반응 측정액중에 cadmium이온과 metallothionein(100 µg/ml)을 동시에 첨가시킨 실험조건에서는 효소활성이 1.82 nmoles/mg protein/min으로서 cadmium이온에 의해 증가되던 효소활성이 약 30% 정도 감소되어짐을 관찰할 수 있었다.

#### 5. Cadmium이온이 유도한 aldehyde oxidase 활성에 미치는 penicillamine의 영향

Penicillamine은 구리를 포함한 여러종류의 금속과 결합하는 성질을 갖고 있는 물질로 분자내에 -SH기를 함유하고 있으며 중금속해독제로 이용되어지고 있는 약물이다(Aaseth, 1976). Cadmium에 의해 유도되는 aldehyde oxidase활성에 미치는 penicillamine의 영향을 관찰하였을 때 cadmium이온에 의해 증가되던 aldehyde oxidase 활성은 penicillamine이 반응액중에 공존하는 조건에서는 대조치의 효소활성 수준으로 현저히 억제됨을 관찰할 수 있었다. 그러나 penicillamine만이 존재하는 실험조건에서는 효소활성에 별다른 영향이 없었다(Fig. 6).

#### IV. 고 찰

Metallothionein의 생합성이 중금속을 위시하여 여러 가지 독성물질에 의해 증가된다는 사실이 최근의 연구 결과에 의해 보고되어지고 있다(Kotsonis and Klaassen, 1979; Onosaka and Cherian, 1981; Wake and Mercer, 1985; Womser and Calp, 1987; Min *et al.*, 1991). 이와 같은 현상은 생체조직이 독성환경으로부터 자신을 방어하는 수단을 동원하는 과정에 metallothionein이 활용될 것이라는 것을 예상할 수 있으나 작용기전에 대해서는 충분히 설명되지 못하고 있는 실정이다. 최근 수은과 납중독 발현과정을 과산화지질의 생성과 관련시켜 검토한 연구보고(Gerhard *et al.*, 1983; Lund *et al.*, 1991)가 있으며 이와 같은 현상은 활성산소의 생성 및 분해효소의 활성변화와 관련하고 있음이 실험적으로 증명되어지고 있다(Woods *et al.*, 1990; Huh *et al.*, 1995). 활성산소들은 생명현상에 필연적으로 수반되는 현상임을 고려하여 이 연구에서는 cadmium에 의해서 유도되어지는 활성산소의 생성과정과 이로인해 야기되는 지질의 과산화반응에 metallothionein이 어떤 영향을 주는가를 관찰하여 metallothionein의 생체방어기전을 검토하였다. 뇌조직을 대상으로 하여 과산화지질의 생성에 미치는 metallothionein의 영향을 관찰하였을 때 metallothionein의 첨가 농도 의존적으로 현저한 생억제현상을 나타내었다. Metallothionein이 뇌조직의 지질 과산화반응을 억제하는 작용은 반응액중에 철이온을 첨가하여 과산화지질의 생성을 증가시킨 실험조건에서 더 현저한 억제작용을 나타내는 것으로 보아 metallothionein의 항산화작용은 지질 과산화반응이 비정상적으로 증가된 상태에서 보다 더 효율적으로 나타나고 있음을 본 실험성적으로 예측할 수 있었다. 뇌조직의 과산화지질 생성은 cadmium첨가에 의해 현저히 증가되었으며 이 현상은 cadmium농도에 비례하고 있는 것으로 보아 cadmium중독발현 과정에 세포막의 과산화지질 생성이 부분적으로 관여하고 있음을 시사하고 있다. 최근 수은의 독성발현 과정에 지질과산화반응이 관여하고 있다는 보고(Gerhard *et al.*, 1983; Lund *et al.*, 1991)와 일맥 상통하는 실험결과로서 중금속류들의 독성을 규명하는데 좋은 참고자료가 될 것으로 생각된다. Metallothionein은 생체내에서 cadmium과 강력한 친화력을 갖고 있으므로 cadmium중독상태에 제일 먼저 동원되어 활용되어질 것이라 짐을 고려(Kojima and Kagi, 1978)할 때 metallothionein의 지질과산화반응 억제작용은 cadmium을 직접 제거하는 작용뿐만 아니라 중금속이나 독성물질들에 의해서 유도되어지는 과산화지질의 생성 증가현상을 조절하므로써 생체

방어기구에 일익을 담당하여 독성상태로 부터 생체를 보호하는데 기여할 것으로 생각되어진다. Aldehyde oxidase는 aldehyde류 뿐만아니라 여러종류의 유기 질소화합물들을 산화시키며 vitamin B6 group의 대사에도 관여하는 효소로서 생화학적 산화반응을 촉매하는 과정에 활성산소를 생성하게 된다(Wolpert *et al.*, 1981). Cadmium이온에 의한 과산화지질의 생성 증가현상을 활성산소 생성효소인 aldehyde oxidase 활성변화와 관련지어 검토한 실험에서 지질의 과산화반응을 촉진시키는 cadmium의 농도는 aldehyde oxidase활성을 현저하게 증가시켰으며 이러한 aldehyde oxidase 활성의 증가는 metallothionein이 공존하는 실험조건에서는 현저하게 억제되었다. 더욱이 뇌를 위시한 모든 생체조직의 기능을 수행하는 과정에 작용하는 활성아민들은 생체내에서 monoamine oxidase에 의해서 biogenic aldehyde form으로 전환되며 이들 활성 aldehyde류들은 다시 aldehyde oxidase에 의해 산화되어 진다는 점을 고려할 때 metallothionein의 aldehyde oxidase 활성조절효과는 생리학적으로 매우 합리적인 의미를 부여할 수 있을 것으로 생각되어진다. 이와 같은 metallothionein의 aldehyde oxidase활성 억제작용은 cadmium이 들어있지 않은 반응조건에서는 나타나지 않는 것으로 보아 metallothionein의 aldehyde oxidase 활성 억제작용은 비정상적으로 aldehyde oxidase 활성이 증가된 병적상태나 독성상태가 유도되어진 병태생리조건 하에서 보다 민감하게 작용이 나타날 것이라는 것이 예상되어지며 이와 같은 현상은 지질의 과산화반응과도 관련지어 metallothionein의 항산화작용 기전을 설명하는 데 중요한 실험자료가 될 것이다. 한편 metallothionein이 cadmium에 의해서 유도되는 aldehyde oxidase 활성 증가현상을 억제하는 작용에 대해서는 metallothionein의 분자구조중에 cadmium과 결합할 수 있는 부위가 여유있게 존재하기 때문에 cadmium을 제거하는 작용을 통해서 cadmium에 의해 나타나는 aldehyde oxidase 활성 증가현상이 억제되어지는 것으로 생각할 수 있다. Penicillamine은 분자구조중의 유리상태의 SH 기를 갖고 있으며 구리이온을 비롯한 중금속류들과 결합하는 물질이다(Aaseth, 1976). Cadmium첨가에 의해 유도되어지는 aldehyde oxidase 활성 증가현상은 penicillamine이 존재하는 실험조건에서는 현저히 억제되었다. Metallothionein의 구조중에도 상당량의 SH 기가 존재하고 있음을 고려하면 이들의 작용은 SH 기와도 관련지어 생각할 수 있으며 이 점에 대해서는 계속적인 연구가 요구되어 진다. 산소라디칼들은 활성이 대단히 강하여 세포막의 지질을 과산화시키는 손상뿐만 아니라 단백질이나 핵산성분에도 작용하여 여

러가지 난치성 성인병의 발병원인을 제공하는 인자로 알려져 있으며 또한 독성물질들의 독성발현과정에도 관여하는 것으로 알려져 있다(McCord and Roys, 1982). Cadmium이 aldehyde oxidase 활성을 증가시키고 이와 같은 현상에 의해 활성산소의 생성이 유도되어지며 생성된 활성산소가 과산화지질의 생성을 증가시키는 일련의 과정이 cadmium의 독성발현 기전중의 하나로 설명할 수 있을 것이다. 생체방어기구에 관여하는 metallothionein의 항산화작용은 생체내에서의 cadmium 제거 작용으로 지질의 과산화반응을 조절하는 작용 뿐만 아니라 활성산소 생성효소인 aldehyde oxidase 활성을 억제하는 작용기전과도 연관지어 설명할 수 있을 것으로 생각되어지며 이에 대한 지속적인 연구를 수행중에 있다.

### 감사의 말씀

이 논문은 1994년 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비일부와 KOSEF 91-07-00-13 일부에 의하여 연구를 수행하였으며 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

- Aaseth, J. (1976): Mobilization of methyl mercury in vivo and in vitro using N-acetyl-DL-penicillamine and other complexing agents, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **39**, 289.
- Bremner, I. (1987): Interactions between metallothionein and trace metals, *Prog. in Food Nutr. Sci.*, **11**, 1.
- Darr, D. and Fridovich, I. (1984): Vanadate and molybdate stimulate the oxidation of NADH by superoxide radical, *Arch. Biochem. Biophys.*, **232**(2), 562.
- Gerhard, G., Walter, P. and Peter, K. (1983): Glutathione depletion and in vitro lipid peroxidation in mercury or maleate induced acute renal failure, *Bi-ochem. Pharmacol.*, **32**, 2969.
- Hamer, D.M. (1986): Metallothionein, *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 913.
- Hollman, W.I.M. and Weigand, C. (1948): The chemical conversion of nicotinic acid and nicotinamide derivatives of N-methyl-2-pyridone by methylation and oxidation, *Biochem. J.*, **43**, 423.
- Huh, K., Shin, U.S. and Park, J.M. (1995): The effect of mercury and lead ion on the brain lipid peroxidation and hepatic free radical generating enzyme activities, *Arch. Pharm. Res.*, unpublished.
- Kagi, J.H., Hunziker, P., Vasak, M. (1990): Metallothionein: Biochemistry and special structure, in *Trace elements in clinical medicine*. Tokyo(Tomita, H., ed.) Springer Verlag, 395.
- Kleinsky, T.A., Tulle, J.V., Cattau, E.L. and Wang, P. (1974): A comparison of the distribution and electron acceptor specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase, *Comp. Biochem. Physiol.*, **498**, 687.
- Kojima, Y. and Kägi, J.H.R. (1978): Metallothionein, *Trends Biochem. Sci.*, **3**, 90.
- Kojima, Y. and Kägi, J.H.R. (1987): Chemistry and biochemistry of metallothionein, *Experientia. Suppl.*, **52**, 25.
- Kotsonis, F.N. and Klaassen, C.D. (1979): Increase in hepatic metallothionein in rats treated with alkylating agents, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **51**, 19.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.
- Lund, B.O., Miller, D.M. and Woods, J.S. (1991): Mercury-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and lipid peroxidation in vitro and in rat kidney mitochondria, *Biochem. Pharmacol.*, **42**, S181.
- Margoshes, M.; Vallee, B.L. (1957): A cadmium protein from equine kidney cortex, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4814.
- McCord, J.M. and Fridovich, I. (1978): The biology and pathology of oxygen radicals, *Ann. Intern. Med.*, **89**, 122.
- McCord, J.M. and Roys, R.S. (1982): The pathophysiology of superoxide: Roles in inflammation and ischemia, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **60**, 1346.
- Min, K.S., Terano, Y., Onosako, S. and Tanaka, K. (1991): Induction of metallothionein by nonmetallic compounds associated with acute phase response in inflammation, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **111**, 152.
- Motahashi, N. and Mori, I. (1983): Superoxide dependent formation of hydroxyl radical catalyzed by transferrin, *FEBS Letts.*, **157**(1), 197.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yaki, K. (1979): Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.*, **95**, 351.
- Onosaka, S. and Cherian, M.G. (1981): The induced synthesis of metallothionein in various tissues of rat on response to metals. I. Effect of repeated injection of cadmium salts, *Toxicology*, **22**, 91.
- Rajagopalan, K.V., Fridovich, I. and Handler, P. (1962): Hepatic aldehyde oxidase, *J. Biol. Chem.*, **237**, 922.
- Wake, S.A. and Mercer, J.F.B. (1985): Induction of metallothionein mRNA in rat liver and kidney after copper chloride injection, *Biochem. J.*, **228**, 425.
- Wolpert, M.K., Althaus, J.R. and Jones, D.G. (1973): Nitroreductase activity of mammalian liver aldehyde oxidase, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **185**, 202.

Womser, U. and Calp, D. (1987): Increased levels of hepatic metallothionein by alcohols: Evidence for an indirect mechanism, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **87**, 257.

Woods, J.S., Carolyn, A., Calas, L.D., Robinson, H. and Mailer, C. (1990): Stimulation of porphyrinogen oxidation by mercury ion, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **90**, 253.