



방사선 조사에 따른 U-937 세포의 Ceruloplasmin 유전자에서 mRNA 발현 변화

오연경¹ · 임희영¹ · 김종수¹ · 윤충효³ · 김인규² · 윤병수¹

¹경기대학교 생물학과, ²한국원자력연구소 방사선생체해석분야, ³농업생명공학연구원 기초기술개발과

Effect of Radiation on mRNA Expression of Ceruloplasmin Gene

Youn Kyoung Oh¹, Hee Young Lim¹, Jong Soo Kim¹, Choong Hyo Yun³, In Gyu Kim²
and Byoung Su Yoon¹

¹Department of Biology, Kyonggi University, Suwon, Kyonggido 442-760

²Department of Radiation Biology, Korea Atomic Energy Research Institute, Taejon 305-600

³Genomic Division, National Institute of Agricultural Biotechnology, Suwon 440-707, Korea

Received December 8, 2003; Accepted January 19, 2004

ABSTRACT. Against environmental stress, ceruloplasmin which is a plasma protein, are believed to play central roles in antioxidant- or peroxidase-activity in blood stream to remove free radicals, which may be caused by exposing of γ -irradiation. In human U-937 cells exposed to γ -irradiation, the levels of mRNA in ceruloplasmin gene were measured on 0, 4, 12, 24 hr after exposing by using comparative RT-PCR (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction) which was achieved to compare with house keeping genes such as β -actin and *hprt*. After γ -irradiation of 100 rads or 200 rads, the total quantities of RNA were increased as dose and time dependent manner. On the contrary, the variation of mRNA expression in ceruloplasmin was not found until 4 hr after irradiation. After 12 hr and 24 hr of irradiation, the levels of mRNA in ceruloplasmin were significantly increased as dose and time dependent manner than un-exposed cells.

Keywords: Ceruloplasmin, γ -irradiation, U-937 cell, RT-PCR.

서 론

Ceruloplasmin은 plasma에 존재하는 copper 함유 단백질로서 그 유전자는 chromosome 3q25에 위치하고 있다(Zhong *et al.*, 2001). 이 단백질은 132 kDa, 1046 아미노산 잔기로 구성되어 있으며, 주로 간세포에서 생성된다(Sato *et al.*, 1991). 이는 한 분자당 6~7개의 copper 분자와 결합할 수 있어, 체내 70~90%의 copper를 운반하며(Harris *et al.*, 1991), copper와 결합되지 않은 ceruloplasmin은 골지체에서 결합하게 된다. 또한 이는

방사선 조사, 조직 손상, 세균감염, 염증의 경우 혈액 내 그 농도가 빠르게 증가되는 급성반응 단백질로 알려져 있다(Ikawa *et al.*, 1990; Magic *et al.*, 1995). 혈장 내에서 일반인의 ceruloplasmin의 농도는 300~500 μ g/ml이지만, Wilson's 환자의 ceruloplasmin 농도는 정상인에 비하여 매우 낮으며(Yukitoshi *et al.*, 1999; Shiono *et al.*, 2001), 방사선 치료를 받는 환자의 경우 체내 ceruloplasmin의 농도는 크게 증가한다(Onizuka *et al.*, 1999).

혈액내의 항산화제로 알려진 ceruloplasmin은 1948년 Holmberg와 Laurell에 의해 처음으로 분리되었으며, 대동맥, 심장, 뇌, 간, 적혈구 등에 존재하며 copper를 운반한다. Ceruloplasmin은 haptoglobin, hemopexin, transferrin, albumin과 함께 세포의 항산화제로서, 이들은 copper, iron과 같은 금속이온과 결합함으로써 금속이온에 의한 활성산소 생성을 억제한다. 금속이온은 활성산소를 생성하는 주된 요소이지만, 정상인의 경우 단백질과 결합되어 있어서 자유 이온 상태로는 존재하지 않는다.

Correspondence to: Byoung Su Yoon, Department of Biology, Kyonggi University, Suwon, Kyonggido 442-760 Korea
E-mail: bsoon@kyonggi.ac.kr

Abbreviations: RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction; FBS, fetal bovine serum; DPBS, Dulbecco's phosphate buffered saline; HPRT, hypoxanthine phosphoribosyl transferase

그러나 생물체가 방사선에 노출되게 되면 생체 내의 copper, iron 등의 금속 이온들이 자유 이온상태로 존재하게 되어 체내에서 산화 반응을 일으킬 수 있다. 그러나 방사능 피폭시 ceruloplasmin의 발현양이 증가되어 자유 이온으로 존재하는 copper나 iron과 결합하여 이러한 산화반응을 막게 되며, 그 이외에도 ceruloplasmin은 SOD와 유사하게 O₂를 제거하여 활성산소에 의한 생체 분자의 손상을 막는다고 알려져 있다(Kim *et al.*, 1998; Kim and Park, 1998).

본 실험에 사용된 U-937 세포는 37세의 남성으로부터 얻은 macrophage의 림프종으로 Sundstrom and Nilsson (1976)에 의해 명명되고 기재되었다.

생물체가 방사능에 노출되면, 노출된 선량에 따라 여러 가지 생체 내 반응이 일어나게 된다. 인체나 다른 생물체의 경우 흡수선량은 같아도 방사선의 종류나 성질에 따라서 영향의 정도가 다른 경우가 있으며, 생체지표로서 생물학적 영향 정도를 나타내는 것, 즉 인체가 받은 방사선의 양인 피폭선량을 측정하는 방법 중 하나로 방사선 민감성 유전자가 주목되고 있다. 방사선에 특이적으로 민감성을 가진 유전자가 있다면 보편화된 실험방법인 PCR을 통하여서도 방사선의 피폭선량을 알아낼 수 있을 것으로 사료된다. PCR을 통하여 피폭선량을 정량할 수 있게 된다면 현재 방사능 피폭선량을 알아보는 HPRT 방법보다 빠르고 민감하게 알아낼 수 있을 것이다.

본 연구는 U-937 세포에서 ceruloplasmin이 방사능 민감성 유전자인지를 확인하기 위하여, 그리고 방사능 노출에 대해 ceruloplasmin의 유전자가 mRNA 수준에서 발현이 증가되는지를 RT-PCR을 이용한 정량법을 이용하여 시간대별로 살펴봄으로써 방사능 노출에 대한 생체지표로서 ceruloplasmin 유전자의 가능성을 증명하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

RPMI-1640, Fetal Bovine Serum(FBS) 및 TRIzol Reagent는 GibcoBRL사에서, HEPES, Sodium bicarbonate, Dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS)은 Sigma사에서 구입하였다. PCR kit와 M-MLV reverse transcriptase는 Geneclone사 제품을 사용하였다.

세포배양

사람 U-937 세포(Korean Type Culture Collection)는 10% FBS가 함유된 RPMI-1640 배지에서 5% CO₂와 37°C가 유지되는 세포배양기에서 배양되었다. 모든 실험은 세포 계대 배양 중 성장기의 세포를 사용하였으며, 세

포 수는 trypan blue 용액으로 염색하여 생세포수를 측정하였다.

방사선 조사

방사선 조사를 위한 U-937 세포는 세포 배양액에 4×10⁵ cells/ml로 준비하였다. 방사선 조사는 ¹³⁷Cs로 100 rad와 200 rad(3000 rad/204 sec) 조사하였다. 각 세포는 조사 또는 처리 후 24시간 배양하고 조사 후 4시간, 12시간, 24시간 배양하고 세포를 수거하여 RNA를 순수 분리 하였다.

RNA 정제

방사선 조사 후 4시간, 12시간, 24 시간별로 세포(5×10⁶ cells)를 수거하여 DPBS 용액으로 1000 rpm, 10분간 1회 세척하였다. 세포 침전물에 1 ml TRIzol 용액을 첨가하여 vortex 후 상온에서 5분, 그리고 chloroform 200 μl를 넣고 vortex 후 상온에서 2~3분 동안 정치하였다. 4°C에서 15000 rpm, 15분 동안 원심분리하여 얻은 450 μl 상등액에 450 μl isopropanol을 넣은 섞은 후 상온에서 10분 동안 정치하였다. 4°C에서 15000 rpm, 15분 동안 원심분리하여 침전물을 얻은 후 75% ethanol로 8600 rpm, 5분간 2회 세척하고 40 μl 증류수에 부유시켰다. 순수분리 된 RNA는 A_{260nm}에서 농도를 측정하였다.

Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Reverse transcription은 1×RT buffer(500 mM Tris-HCl, pH 8.3, 300 mM KCl, 80 mM MgCl₂, 100 mM DTT), 0.25 mM dNTP, 4 units Ribonuclease Inhibitor, 1 pmole Random Primer, 100 units M-MLV reverse transcriptase, 그리고 1 μg, 5 μg의 total RNA로 조성된 10 μl의 반응액을 45°C에서 45분간 처리하여 반응을 시행하였다.

반응 후 이 조성액에 1.5 mM MgCl₂, 100 pmole primers, 25 uM dNTP, 그리고 1×PCR buffer(100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 1% Triton X-100), 5 units Taq polymerase의 혼합액 90 μl를 첨가하였다. 반응액은 94°C에서 3분간 변성시키고 94°C에서 30초, ceruloplasmin의 경우는 55°C에서, HPRT의 경우는 50°C에서, β-actin의 경우는 59°C에서 30초간 annealing을 수행하여 72°C에서 1분을 30회 반복하여 증폭시킨 후 72°C에서 5분간 반응시켰다(Perkin Elmer 9600). 2차 PCR에서는 ceruloplasmin과 HPRT의 경우는 1차 PCR 반응생성물 1 μl, β-actin의 경우는 1차 PCR

Table 1. Primers used for amplification and sequences

Gene (GenBank accession)	Primer	Primer sequence (5'→3')
Ceruloplasmin (NM_000096)	CP-C	GCTGGTACCTAGAAGACAAC
	CP-B	TGAGGGGATATGCTCCTTTG
	CP-A	ACCTACTGCTCAGAACCAGA
	CP-D	GGTACTCTGATGGTGTCTC
HPRT (NM_000194)	RTHP-3	CTGCTCCGCCACCGGCTTCC
	RTHP-4	CCTGAGCAGTCAGCCCAGCGC
	RTHP-A	CAATAGGACTCCAGATGTT
	RTHP-B	GATAATTTTACTGGCGATGT
β -actin (NM_001101)	β -actin(as) β -actin(s)	GAGCTGCGTGTGGCTCCCCGAGG CGCAGGATGGCATGGGGGAGGGCATACCCC

반응 생성물을 100배 희석하여 1 μ l를 2차 PCR primer를 사용하여 1차 PCR과 동일한 조건에서 수행하였다.

PCR에 사용한 primer는 미국 국립 의학 도서관에서 제공하는 GenBank 데이터베이스에서 얻은 염기서열을 기초로 하여 제작하였다(Table 1). Ceruloplasmin의 1차 PCR시에는 CP-C와 CP-B primer를 사용하였으며 2차 PCR시에는 CP-A와 CP-D primer를 사용하였다. HPRT의 1차 PCR은 RTHP-3과 RTHP-4, 2차 PCR에서는 RTHP-A, RTHP-B를 사용하였다. β -actin은 1, 2차 PCR 모두 β -actin(as), β -actin(s) primer를 사용하였다.

PCR product의 정량 및 전사체양의 계산

반응이 끝난 PCR product는 2% agarose gel에서 TAE buffer(8 mM acetate, 2 mM EDTA, 80 mM Tris, pH 8.0)를 사용하여 전기영동 하였다. Ceruloplasmin RT-PCR product의 확인은 유전자 내에 존재하는 *KpnI* 절단자리를 제한효소로 절단하여 확인하였다. 전개된 gel은 ethidium bromide로 염색하여 Image Analysis System(Vilber Lourmat, France)으로 각 산물(밴드)의 밀도를 측정하였다.

Ceruloplasmin RT-PCR 산물의 양은 total RNA 1 μ g과 5 μ g을 사용한 각 역전사 반응 중 모든 조건에서 band를 형성하는 5 μ g total RNA를 사용한 PCR product를 전기영동하여 Image Analyse System으로 정량하고, HPRT, β -actin의 밀도값과 비교, 계산하여 상대 정량 값으로 나타내었다.

결과 및 고찰

생물체의 방사능에 대한 방어기작은 다양하다. 방사능 노출시 생물체는 이온화 등이 일어나는 물리적 단계와 이러한 물리적 변화에 따르는 여러 가지 화학적 반응이 일어나는 화학적 단계를 거쳐 생물학적 효과가 일어나게 된다. 방사선은 세포분열을 지연시키는 효과를 나타내는데

분열지연의 강도는 방사선량, 방사선 조사 시의 세포주기, 세포의 종류 등 여러 가지 요인들의 영향을 받게 된다. 정량에 사용된 ceruloplasmin은 항산화 기능을 하는 급성 반응 단백질로서 방사능에 대하여 선량별(100 rad, 200 rad), 시간별(4시간, 12시간, 24시간)로 발현량을 RT-PCR을 통하여 측정하였다.

Ceruloplasmin 유전자의 1차 PCR product는 736 bp, 2차 PCR product는 707 bp이며, 이는 *KpnI* restriction enzyme으로 restriction analysis를 통하여 확인하였고, 또한 클론화하여 염기서열을 확인하였다. 이 실험에서 control로 사용된 β -actin과 HPRT(hypoxanthine phosphoribosyl transferase) 유전자는 house keeping gene으로, 외부 환경의 변화에도 변함없이 일정하게 발현하는 유전자로 mRNA 발현양의 증감을 조사하는 micro-array나, Northern blot 등의 분석에서 control로 사용된다. Ceruloplasmin의 유전자는 1차 PCR을 통해서는 증폭 결과를 볼 수 없으므로 β -actin과 HPRT 모두 2차 PCR product를 정량에 사용하였다. HPRT는 ceruloplasmin과 같이 1차 PCR을 통해서는 증폭 결과를 볼 수 없으므로 ceruloplasmin과 동일하게 1차 PCR product를 1 μ l를 2차 PCR에 사용하였다. β -actin과 같은 경우는 1차 PCR에서도 증폭 결과를 확인할 수 있으므로 1차 PCR product를 100배로 희석하여 이를 ceruloplasmin이나 HPRT와 같이 1 μ l를 2차 PCR에 사용하여 증폭하였다. RT-PCR시 RNA 농도를 5 μ g과 1 μ g으로 사용하였으나 측정하고자 하는 유전자인 ceruloplasmin이 RNA 1 μ g으로 RT-PCR시 전기영동시 농도가 흐려서 RNA 5 μ g으로 RT-PCR을 한 2차 PCR product를 정량에 사용하였다.

U-937 세포는 4×10^5 /ml로 배양을 시작하여 irradiation 하였다. 세포의 수는 4시간 후 Irradiation 하지 않은 보통의 세포는 3.5×10^5 /ml, 100 rad 방사선 조사의 경우 2.7×10^5 /ml, 200 rad 방사선 조사의 경우 2.5×10^5 /ml으로 방사선에 대한 세포의 일련의 기작들이 시작되지 않은 것

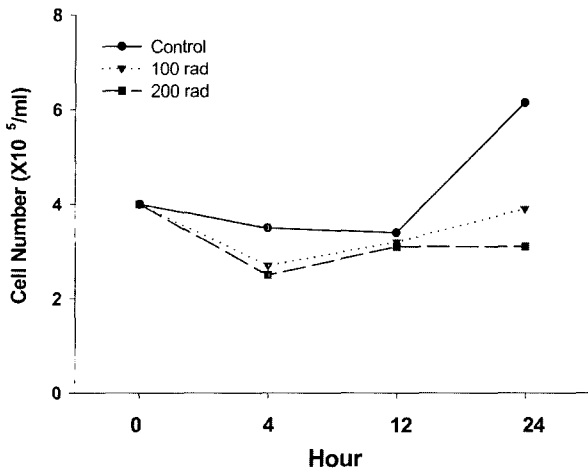


Fig. 1. The survival of U-937 cells exposed to γ -radiation (100 rad, 200 rad).

으로 사료된다. 그러나 12시간 후 irradiation 하지 않은 보통의 세포는 $3.4 \times 10^5/\text{ml}$, 100 rad 방사선 조사의 경우 $3.2 \times 10^5/\text{ml}$, 200 rad 방사선 조사의 경우 $3.1 \times 10^5/\text{ml}$ 으로, 24시간 후 irradiation 하지 않은 보통의 세포는 $6.15 \times 10^5/\text{ml}$, 100 rad 방사선 조사의 경우 $3.9 \times 10^5/\text{ml}$, 200 rad 방사선 조사의 경우 $3.1 \times 10^5/\text{ml}$ 로 방사선의 노출로 인해 세포분열이 지연됨을 볼 수 있었다(Fig. 1).

방사능 조사시 1×10^6 의 세포당 total RNA양의 변화는 irradiation 하지 않은 보통 세포의 경우 4시간에서 24.336 μg , 12시간에서 30.8 μg , 24시간에서 28.08 μg 이 순수분리 되었다. 100 rad의 경우는 각각 33.456 μg , 32.464 μg , 34.512 μg , 그리고 200 rad의 경우는 32.736 μg , 28.32 μg , 33.12 μg 의 total RNA가 순수분리 되었다(Fig. 2). Total RNA 양은 irradiation 후 100 rad의 경우 4시간과 12시간, 그리고 24시간에서 각각 1.37배, 1.05

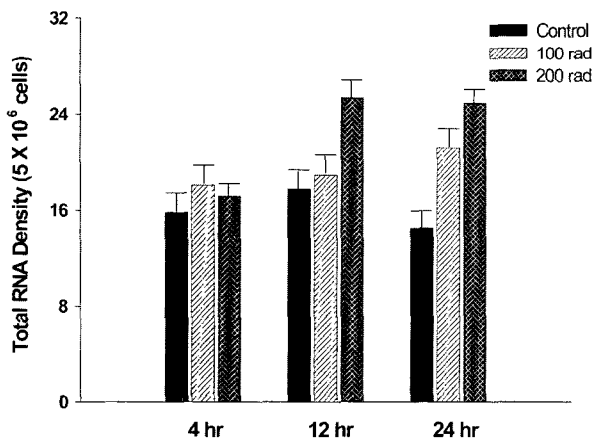


Fig. 2. Variation of total RNA quantity.

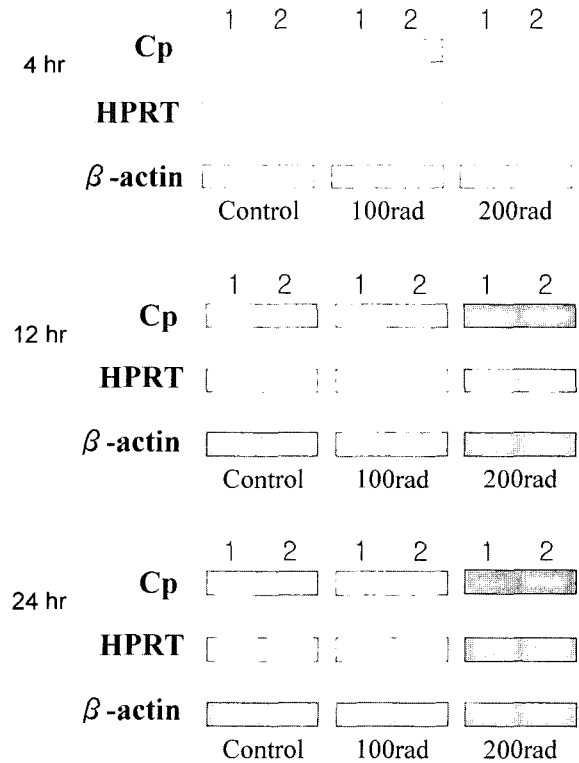


Fig. 3. Ceruloplasmin gene expression in U-937 cells irradiated with γ -radiation (100 rad, 200 rad) cDNA of each gene was reversed-amplified by RT-PCR using specific primer pairs. Cp, ceruloplasmin; HPRT, hypoxanthine phosphoribosyl transferase Lane 1, 5 μg total RNA; Lane 2, 1 μg RNA.

배, 1.23배로 증가하였고, 200 rad의 경우는 각각 1.35배, 0.92배, 1.18배로 증감하였다(Fig. 3). 따라서 방사능 조사를 했을 때 total RNA 양은 100 rad와 200 rad의 경우 total RNA의 양은 irradiation 후 4시간과 24시간에서는 증가하지만, 12시간에서는 약간 감소하거나 irradiation 하지 않은 세포와 거의 비슷한 양을 발현하는 것으로 사료되었다.

Total RNA 5 μg 과 1 μg 으로 RT-PCR과 각 primer를 이용하여 PCR한 전사체의 양은 2% agarose gel에 전기영동으로 전개 시킨 후 Image Analysis System을 통하여 정량하였다. Irradiation 후 4시간에서는 2차 PCR 전사체의 양을 Image Analysis System으로 정량하였을 때 irradiation 하지 않은 RNA의 PCR 전사체의 경우 total RNA 5 μg 과 1 μg 에서 각각 β -actin의 경우 268900, 233500, HPRT의 경우 6930, 6227, ceruloplasmin의 경우 5383, 4366이었고, 100 rad irradiation 한 것의 경우 각각 153500과 190800, 5458과 4471, 5506과 4513이었으며, 각각 200 rad irradiation한 것의 경우 각각 161700과 163200, 4505와 4202, 926과 4440이었

다. Irradiation 후 12시간의 경우는 irradiation하지 않은 경우 β -actin이 294500과 330500, HPRT의 경우 7056과 8545, ceruloplasmin의 경우 6882와 5764로 나타났다. 100 rad irradiation 후 12시간의 경우는 207000과 221400, 7056과 8545 그리고 6882와 5764로 나타났으며, 200 rad의 경우 212800과 287600, 6147과 7336, 8064와 7666으로 나타났다. 또한 irradiation 후 24시간의 경우는 350400과 334200, 6120과 5705, 5826과 6395로 나타났고, 100 rad irradiation 한 경우 110300과 306100, 2637과 2044, 5572와 6371로 나타났다. 200 rad의 경우는 142700과 210200, 2095와 2657, 그리고 2305와 5884로 나타났다.

U-937 cell을 ^{137}Cs 로 100 rad와 200 rad로 방사능 조사 한 후 4시간, 12시간, 24시간으로 각각 배양하여 유전자의 발현양 증감을 β -actin과 HPRT와 비교하여, RT-PCR을 통하여 정량하였다. 방사선 조사 후 4시간에서는 β -actin과 비교하였을 때 100 rad의 경우 1.27배, 200 rad의 경우 1.45배로 증가하였고, HPRT와 비교하였을 때 역시 100 rad의 경우 1.44배, 200 rad의 경우 1.51배로 역시 증가하는 것으로 나타났다. 방사선 조사 후 12시간에서는 β -actin과 비교한 경우 100 rad에서는 1.35배, 200 rad의 경우에는 1.53배로 증가하였으며, HPRT와 비교하였을 경우 100 rad의 경우 1.07배, 200 rad의 경우 1.55배로 증가하는 것으로 나타났다. 또한 24시간 후에는 β -actin과 비교 시 100 rad의 경우 1.09배, 200 rad의 경우 1.47배 증가하는 것으로 나타났으며, HPRT와 비교 시에는 100 rad의 경우는 2.78배, 200 rad의 경우는 1.98배로 약감 감소함을 나타냈다(Fig. 4).

이러한 결과로 미루어 볼 때 100 rad로 γ irradiation한 경우 4시간 후에는 발현양이 약간 감소하지만, 12시간 후부터 24시간까지는 ceruloplasmin의 mRNA 발현이 증가함을 볼 수 있었다. Ceruloplasmin은 항산화 기능을 가지고 있어, 방사능 피폭될 때 증가되는 자유 금속이온과의 결합을 위해 방사능 피폭되면 그 농도가 증가된다고 알려져 있다. 하지만 이 유전자가 방사선 피폭 민감성 유전자인지, 항산화 민감성 유전자인지는 아직 논란이 많이 되고 있다. 그러나, U-937 세포에서 산화를 유발하는 H_2O_2 를 처리하였을 때는 ceruloplasmin의 mRNA 유전자의 발현양 증감이 없다고 보고 되어 있다(Oh *et al.*, 2002). 이러한 결과로 보았을 때 ceruloplasmin은 항산화 민감성 유전자라기보다는 방사선 피폭 민감성 유전자라고 할 수 있으며, ceruloplasmin의 mRNA 유전자는 방사선 피폭 후 24시간 후까지는 발현량이 증가함을 알 수 있었다.

mRNA의 발현량을 측정하는 데에는 Northern blot이

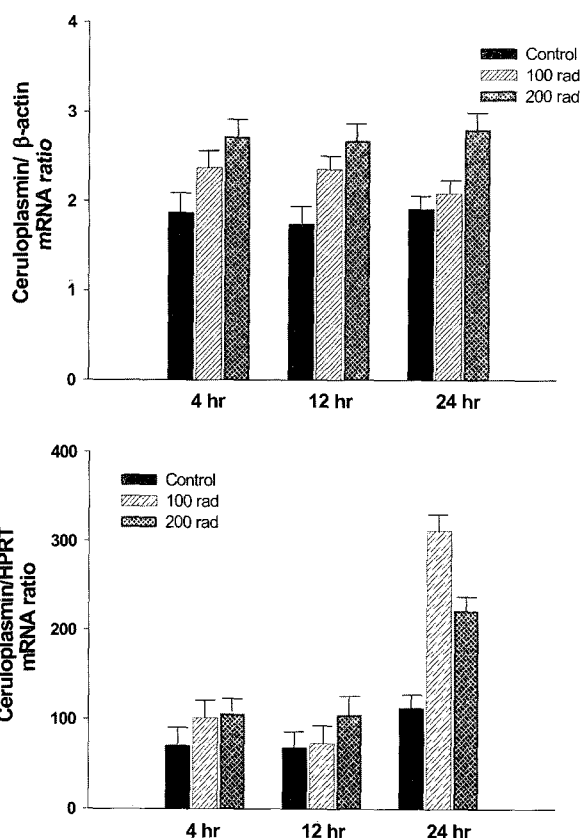


Fig. 4. Comparative quantity of ceruloplasmin mRNA in U-937 cells exposed with γ -irradiation. cDNA of each gene was reversed-amplified from 5 μg total RNA. After electrophoresis, each band of RT-PCR products was quantified by densitometry. Comparative quantity of ceruloplasmin mRNA was expressed as ratio of densitometric units of ceruloplasmin/ β -actin (A) and *hprt* (B).

나 Dot blot 방법이 많이 사용되지만, 비교적 번거로운 실험과정을 요구한다는 단점을 가지고 있다. 그러나, RT-PCR을 이용한 정량법은 소량의 RNA를 증폭하여 발현양상을 확인할 수 있어 많은 연구에서 사용되었다. 새로운 방법으로 수많은 유전자의 발현 양상을 한번에 연구할 수 있는 microarray 즉 DNA chip방법이 최근은 많이 이용되고 있다. 방사선 피폭 유전자에 관한 연구도 DNA chip을 이용하여 유전자 발현 양상을 비교분석 한다면 ceruloplasmin과 더불어 방사선 민감성 반응 유전자에 대한 연구가 가능할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 과기처 국가 원자력 중장기 연구개발사업의 연구비(과제번호 M20104000033-01A0400-01521) 지원에 의하여 수행되었습니다.

참고문헌

- Harris, E.D. (1991): Copper transport: an over view. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **196**, 130-140.
- Ikawa, M. and Shozen, Y. (1990): Quantification of acute phase proteins in rat serum and in the supernatants of a cultured rat hepatoma cell line and cultured primary hepatocytes by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods*, **134**, 101-106.
- Kim, I.G. and Park, S.Y. (1998): Requirement of intact human ceruloplasmin for the glutathione-linked peroxidase activity. *FEBS Lett.*, **437**, 293-296.
- Kim, I.G., Park, S.Y. Kim, K.C. and Yum, J.J. (1998): Thiol-linked peroxidase activity of ceruloplasmin. *FEBS Lett.*, **431**, 473-475.
- Magic, Z., Matic-Ivanic, S., Savic, J. and Poznanovic, G. (1995): Ionizing radiation-induced expression of the genes associated with the acute response to injury in the rat. *Radiat. Res.*, **143**, 187-193.
- Oh, Y.K., Park, S.H., Kim, I.G. and Yoon, B.S. (2002): Ceruloplasmin gene expression in U-937 cells exposed to gamma-irradiation and H₂O₂. *Environmental Mutagens & Carcinogens*, **22**, 76-82.
- Onizuka, K., Migita, S., Yamada, H. and Matsumoto, I. (1999): Serum protein fractions in patients with laryngeal cancer undergoing radiation therapy. Possibility as prognostic factor. *Fukuoka Igaku Zasshi*. **90**, 46-58.
- Sato and Gitlin, J.D. (1991): Mechanisms of copper incorporation during the biosynthesis of human ceruloplasmin. *J. Biol. Chem.*, **266**, 5128-5134.
- Siono, Y.S., Wakusawa, H., Hayashi, H., Takikawa, T., Yano, M., Okada, T., Abuchi, H., Kono, S. and Miyajima, H. (2001): Iron accumulation in the liver of male patients with Wilson's disease. *Am. J. Gastroenterol.*, **96**, 3417-3151.
- Yukitoshi, Y., Tsugutoshi, A., Shinichirou, A., Toshihiro, O., Gorou, T., Teruo, K., Yousuke, S., Morimi, S., Masanori, K., Michinori, I. and Fumio, E. (1999): Mass screening for Wilson's disease: Results and recommendations. *Pediatrics International*, **41**, 405-408.
- Zong, M.Q. and Ye, K. (2001): Rethinking the role of ceruloplasmin in brain iron metabolism. *Brain Research Review*, **35**, 287-294.