

原 著

塩化水銀誘導性ラット腎障害モデルを用いた  
 ストレス耐性獲得機序に関する研究  
 —ACTHによる細胞内グルタチオン増加の役割—

東京女子医科大学 第二内科学教室 (主任：出村 博教授)

小 笠 原 枝 子

(受付 平成8年11月1日)

**The Mechanism of Stress-induced Activation of Defense System:  
 The ACTH-induced Elevation of Intracellular Glutathione Content**

**Makiko OGASAWARA**Department of Medicine II (Director: Prof. Hiroshi DEMURA)  
Tokyo Women's Medical College

The cellular defense systems protect the living body against stress exposure and raise its resistance to harmful stress. The cellular mechanism of this stress-induced resistance, however, remains unknown. The present study was conducted to clarify this mechanism. We found that laparotomy, conducted two days before the subcutaneous administration of  $\text{HgCl}_2$ , reduced the extent of  $\text{HgCl}_2$ -induced acute renal tubular necrosis (oxidative stress). Glutathione (GSH), the most abundant and ubiquitous cellular antioxidant, was found to have increased in the kidneys, but not in the adrenals or liver of rats two days after laparotomy. This finding suggests that laparotomy-induced elevation of GSH content raises resistance against oxidative stress.

LLC-PK1 cells, i.e., porcine renal tubule-derived cells, were cultured with butionine salfoximine (BSO), a  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase inhibitor, and cellular GSH contents were reduced. Cells were then exposed to  $\text{HgCl}_2$ . LDH leakage in the medium increased significantly in BSO-pretreated cells, but not in nontreated cells. This in vitro finding confirmed the protective role of GSH against oxidative stress.

We then examined the possible participation of the pituitary-adrenal axis in the laparotomy-induced increase in renal GSH. Laparotomy stress activates the pituitary-adrenal axis as is evidenced by the fact that rats undergoing laparotomy had significantly heavier adrenals than those not undergoing it. Two days' administration of ACTH increased renal and adrenal GSH contents significantly in a dose-dependent manner, but not hepatic content. Pretreatment with ACTH also prevented  $\text{HgCl}_2$ -induced renal damage.

In conclusion, we demonstrated that laparotomy-induced resistance to oxidative stress may be mediated by the activation of the pituitary-adrenal axis and the elevation of renal GSH contents.

## 緒 言

生体はストレスに対して種々の防御機構を有

し、ストレス暴露に続き非特異的な抵抗性を獲得する。好気性生物は、酸化ストレスに対し細胞内

外のあらゆる分画に抗酸化機構を備え、活性酸素、フリーラジカルによる酸化的傷害から自らを保護している。代表的な細胞防御因子としては、抗酸化酵素として働くグルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-Px)、カタラーゼ (CAT)、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、ヘムオキシダーゼ-1などが、また、非酵素的抗酸化物であるグルタチオン、ビタミン E、ビタミン C、 $\beta$ -カロチン、ビリルビン、尿酸、熱ショック蛋白 (HSP) などがあげられる<sup>1)</sup>。これら防御因子の減少は、組織の酸化的傷害を増加させる。しかし、細胞レベルでの防御機構活性化のメカニズムは未だ充分には解明されていない。

ラットを使った動物実験で xenobiotics の一つである  $\text{HgCl}_2$  を投与し酸化ストレスを加えると、過剰なフリーラジカルが産生され、その効果が細胞の抗酸化物質の活性を上まわると尿細管傷害による急性腎不全を発生する<sup>2)~4)</sup>。

今回、異なるストレスである開腹ストレスを前処理することで、 $\text{HgCl}_2$  投与による酸化的傷害に対し細胞抵抗性 (ストレス耐性) を獲得するか否か、そしてそのメカニズムは何か、を細胞の防御因子グルタチオンの動向に着目して検討した。

## 対象と方法

### 1. 対象

9週齢の成熟したウィスター系雄ラット (日本医科学動物資材研究所) を用いた。ブタの近位尿細管細胞の継代株である LLC-PK1細胞は、3% ウシ胎児血清含有メジウム199 (Gibco Lab.) で継代した。また、実験は「動物実験に関する指針」 (日本実験動物学会) に基づき、「東京女子医科大学動物実験倫理委員会」の許可を得て行われた (整理番号: 95-19)。

### 2. 方法

#### 1) $\text{HgCl}_2$ 誘導性急性腎不全

$\text{HgCl}_2$  投与によるラット急性腎不全モデルについては以前に報告した<sup>2)</sup>。 $\text{HgCl}_2$  は 2.25mg/kg 体重で 50% の死亡率をもたらす。1.5mg/kg 体重では生存率 100% であるが、血清クレアチニン (Cr) の有意な増加をもたらす<sup>2)</sup>。今回の実験では生理食塩水にて溶解した  $\text{HgCl}_2$  (1.5mg/kg 体重) を皮

下注射した (n=4)。コントロールには 0.5ml の生理食塩水を皮下注射した (n=4)。投与後 4 日目に断頭屠殺し、血液、各臓器 (腎、肝、副腎) を採取した。

#### 2) 開腹ストレス

ラットに 0.1ml/100g 体重のネンブタールを腹腔内に投与し、麻酔下で開腹、クリップで閉腹処理を施した (開腹と表示: n=6)。開腹術後、1 日目、2 日目で断頭し直ちに血液、各臓器を採取した。対照としてネンブタール投与のみのラット (麻酔と表示: n=4)、無処置のラット (コントロールと表示: n=6) を用いた。

#### 3) 細胞内グルタチオン濃度の測定

腎皮質、肝、副腎を摘出し、直ちに 5% トリクロロ酢酸含有 0.01M EDTA を添加し、ホモジネイトした。その後、その細胞分画中の還元型グルタチオン (GSH) 濃度を Chung と Maines の方法で測定した<sup>5)</sup>。

#### 4) z-ACTH 投与

10 $\mu\text{g}$ /100g 体重/日 (低容量群: n=7) または 40 $\mu\text{g}$ /100g 体重/日 (高容量群: n=7) の z-ACTH (酢酸テトラコサチド, 第一製薬, 東京) を連日 2 日間皮下注射し、その翌日に断頭処理した。コントロール群 (n=7) には 0.5ml の生理食塩水を皮下注射した。

5) 近位尿細管細胞の継代株 LLC-PK1細胞における  $\text{HgCl}_2$  誘導性細胞障害

(1) LLC-PK1細胞を 1, 5 $\mu\text{M}$  の  $\text{HgCl}_2$  含有メジウム199で 3時間 37°C で培養、その後直ちに培地中に逸脱した LDH の活性を測定し、細胞障害度を判定した。LDH 活性の測定には non-radioactive cytotoxicity アッセイキット (Promega Inc., Wisconsin) を用いた。

(2) GSH 合成律速酵素阻害薬である butionine sulfoximine (BSO) 300 $\mu\text{M}$  で 24時間前培養した後、1, 5 $\mu\text{M}$  の  $\text{HgCl}_2$  で 3時間培養、培地中の LDH 活性を測定した。BSO で前培養後  $\text{HgCl}_2$  非添加群をコントロール群とした。

#### 6) 統計学的検定

結果は、平均±標準偏差で表し、StatView-J 4.11を用いて、ANOVA 分析を施行した。p<0.05

をもって有意とした。

## 結 果

### 1. HgCl<sub>2</sub>誘導による急性腎不全

HgCl<sub>2</sub>投与で急性腎機能障害が発生し、血清 Cr はコントロール群0.3mg/dl に比較し0.93±0.26 mg/dl と有意に高値であった。開腹ストレス+HgCl<sub>2</sub>投与群の血清 Cr は0.51±0.07mg/dl と血清 Cr の上昇は抑制され、開腹ストレスラットは腎障害に抵抗性を獲得していることが明らかとなった (図1)。

### 2. 開腹ストレスによる細胞内 GSH 含量の変動

開腹術の各組織 GSH 含量へ与える影響を調べた。開腹ストレス後1, 2日目に検討した。

腎皮質の GSH 含量は開腹ストレス後1日目でコントロール群1,203.2±286.5nmol/g wet tissue に対し開腹群1,420.3±248.0nmol/g wet tissue と上昇傾向を示し、開腹ストレス後2日目では、コントロール群652.1±207.3nmol/g wet tissue に対して開腹群で969.0±218.6nmol/g wet tissue であった。いずれも1日目と比較し減少していたが、開腹群ではコントロール群に比し有意な高値を示した (図2)。

副腎の GSH 含量については、麻酔2日目では

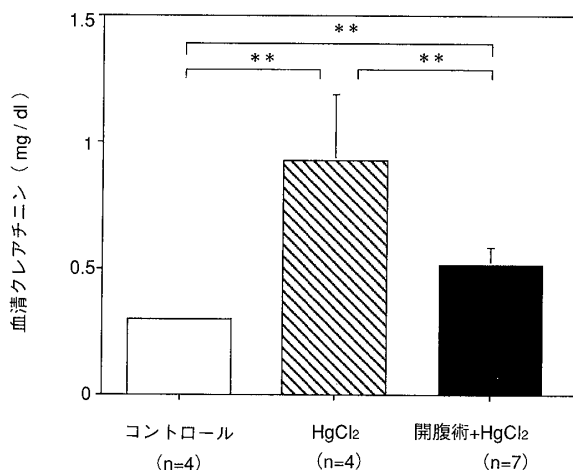


図1 HgCl<sub>2</sub>投与による腎機能障害と開腹術の影響  
HgCl<sub>2</sub> (1.5mg/kg 体重) 皮下注射後4日目の血清クレアチニン値を示す。コントロールは生理食塩水 (0.5 ml) 皮下注射、開腹術+HgCl<sub>2</sub>は HgCl<sub>2</sub>投与2日前に開腹術を施行した。括弧内はラットの匹数を示す。  
\*\* : p<0.01.

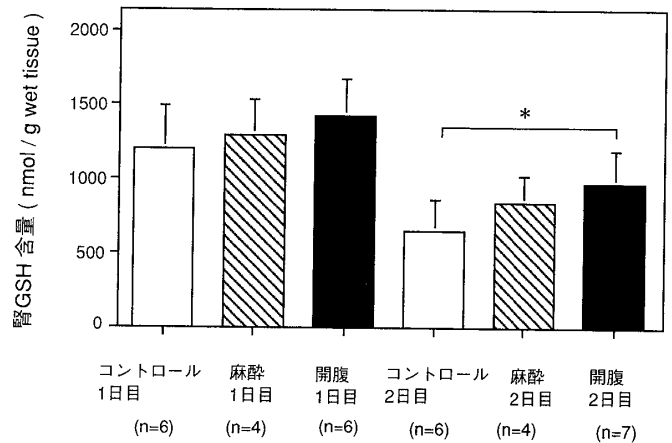


図2 開腹術施行後の腎 GSH 含量  
開腹術施行後1日目, 2日目を示す。対照として麻酔のみ, 無処置群(コントロール)を置いた。\* : p<0.05.

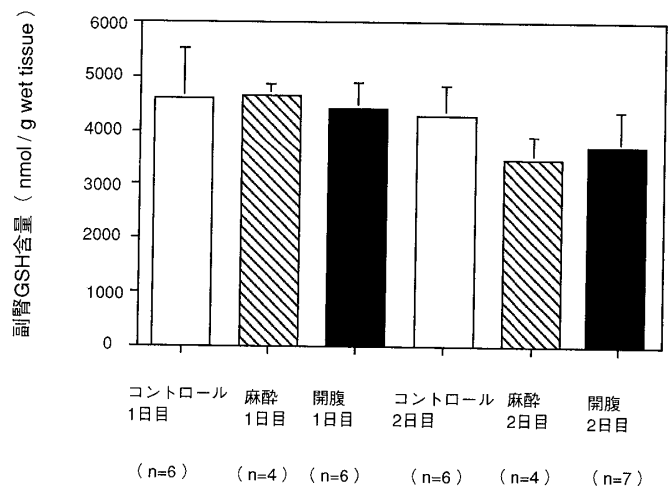


図3 開腹術施行後の副腎 GSH 含量  
図2参照。

ずれも1日目と比較し減少していたが、開腹群ではコントロール群に比し有意な変動は認めなかった (図3)。

肝臓の GSH 含量は、開腹1日目で6,781.8±686.4nmol/g wet tissue と有意な上昇を示したが、開腹2日目ではコントロール2日目と同一レベルであった (図4)。

### 3. 開腹ストレスに伴う副腎の重量変化

開腹1日目において副腎重量の有意な増加を認めた (図5)。

### 4. z-ACTH 投与による副腎重量の変化

副腎の重量はコントロール群0.042±0.004g に対して z-ACTH 低容量投与群0.063±0.007g, 高

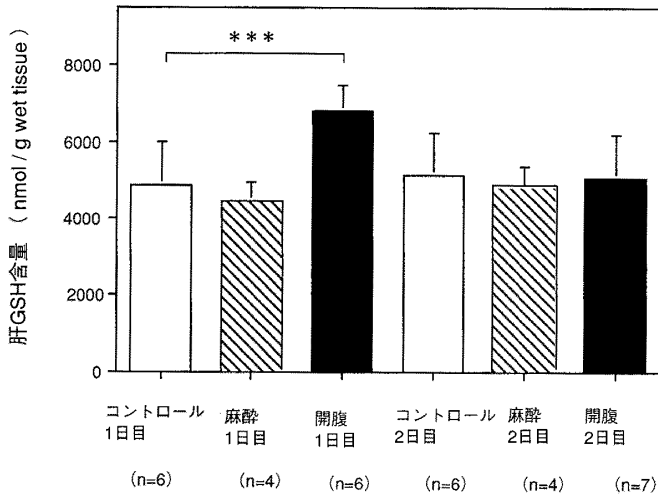


図4 開腹術施行後の肝臓 GSH 含量  
図2 参照. \*\*\* :  $p < 0.001$ .

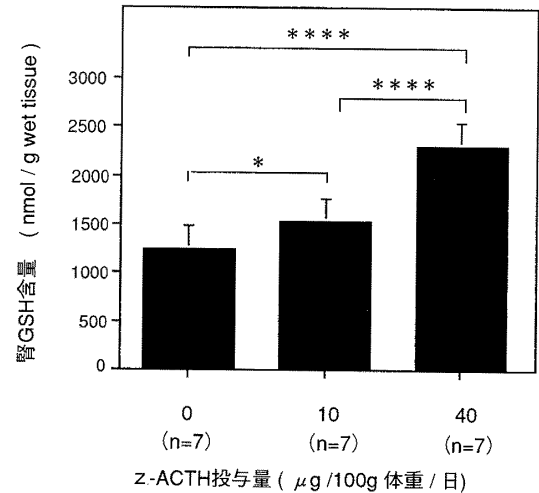


図6 z-ACTH 投与後の腎 GSH 含量  
z-ACTH は2日間連日投与した. \* :  $p < 0.05$ ,  
\*\*\*\* :  $p < 0.0001$ .

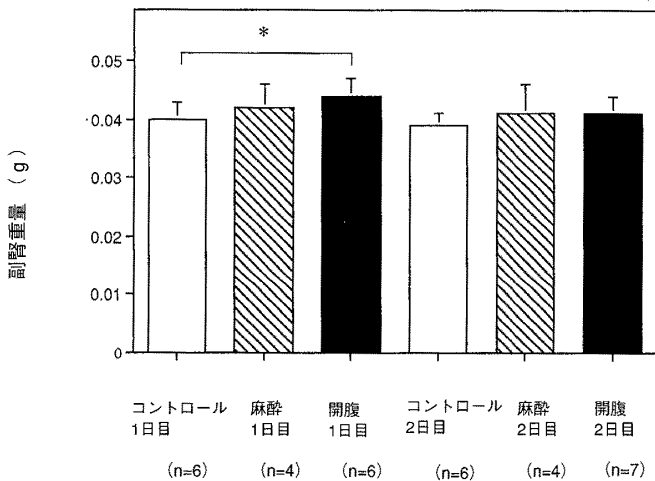


図5 開腹術施行後の副腎重量  
図2 参照. \* :  $p < 0.05$ .

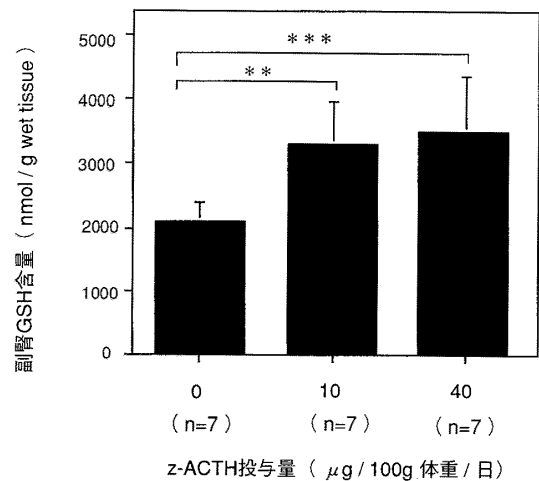


図7 z-ACTH 投与後の副腎 GSH 含量  
図6 参照. \*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.001$ .

容量投与群  $0.106 \pm 0.02g$  と有意な増加を認め、副腎重量は z-ACTH の投与量に容量依存的に増加した (各群間  $p < 0.001$ )。

#### 5. z-ACTH 投与による細胞内 GSH 含量

腎皮質の GSH 含量はコントロール群  $1,245.9 \pm 232.9 \text{ nmol/g wet tissue}$  に対し、z-ACTH を投与することにより低容量群  $1,532.1 \pm 243.4 \text{ nmol/g wet tissue}$ 、高容量群  $2,311.2 \pm 231.2 \text{ nmol/g wet tissue}$  と容量反応性を持つ有意な増加を示した (図6)。

副腎の GSH 含量はコントロール群  $2,097.2 \pm 290.5 \text{ nmol/g wet tissue}$  に対し、低容量群  $3,288.0 \pm 659.2 \text{ nmol/g wet tissue}$ 、高容量群

$3,486.5 \pm 865.4 \text{ nmol/g wet tissue}$  といずれも有意な増加を示した (図7)。

肝臓の GSH 含量は z-ACTH 投与群で有意な変化を示さなかった (データ省略)。

#### 6. $\text{HgCl}_2$ 誘導性急性腎不全に対する z-ACTH の効果

$\text{HgCl}_2$  投与に先立ち z-ACTH  $40 \mu\text{g}/100g$  体重/日、2日間、前投与したラットでの血清 Cr は  $0.42 \pm 0.12 \text{ mg/dl}$  であり、 $\text{HgCl}_2$  のみ投与した群と比較して有意に低値であった (図8)。ACTH の前投与は急性腎不全を軽減したことを示している。

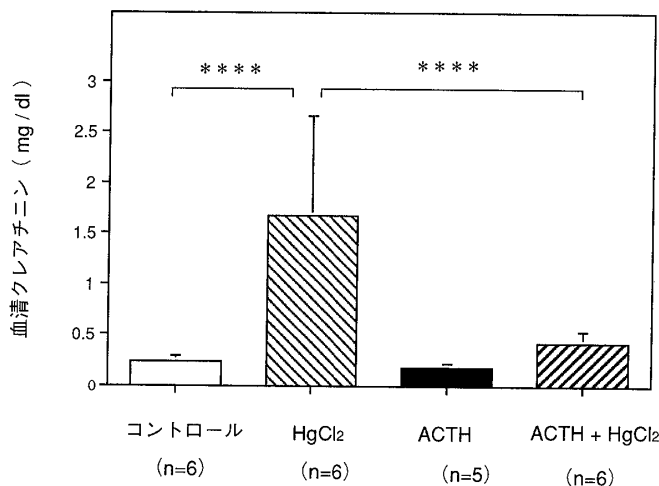


図8 HgCl<sub>2</sub>投与による腎機能障害とACTHの影響  
HgCl<sub>2</sub> (1.5mg/kg 体重: HgCl<sub>2</sub>群) または生理食塩水を皮下注射 (コントロール群) し, その後4日目の血清クレアチニンを示す。  
ACTH (40μg/100g 体重) を2日間投与し, 続いて生理食塩水 (ACTH 群) またはHgCl<sub>2</sub> (上記と同量: ACTH+HgCl<sub>2</sub>群) を投与後4日目の血清クレアチニンを示す。\*\*\*\*: p<0.0001.

## 7. 近位尿細管継代株 LLC-PK1細胞におけるHgCl<sub>2</sub>誘導による細胞障害性

LLC-PK1細胞にHgCl<sub>2</sub>を添加し酸化ストレスを加えると, コントロールに比し1, 5μMのHgCl<sub>2</sub>投与群では, 逸脱LDHの増加を認めなかった。しかし, GSH合成律速酵素阻害薬であるBSOを前投与しておくくと未処理群に比し5μMのHgCl<sub>2</sub>ではLDHの逸脱は有意に大きく, 細胞の易障害性が増強したことが示された (図9)。

## 8. BSO, HgCl<sub>2</sub>投与によるLLC-PK1細胞内GSH含量

BSO投与により細胞内GSH含量は有意に減少した(51.2±5.4%)。HgCl<sub>2</sub>により細胞に酸化ストレスが加わり, GSH含量が減少することもHgCl<sub>2</sub>容量反応性に認められた。BSOを前投与した際もHgCl<sub>2</sub>濃度に依存したGSH含量の減少傾向が認められた (図10)。

### 考 察

高濃度のHgCl<sub>2</sub>の投与は, 急性尿細管壊死をもたらすことにより酸化ストレスによる障害モデルとして知られている<sup>3)4)</sup>。

本研究の結果, 開腹ストレスを前投与しておく

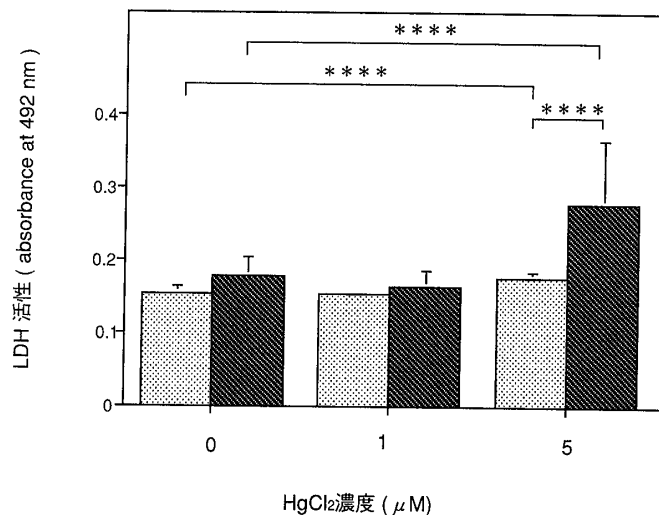


図9 HgCl<sub>2</sub>によるLLC-PK1細胞の障害  
細胞はBSO (300μM 24時間) 添加群 (■), 無添加群 (□) に分け, 最後に表示濃度のHgCl<sub>2</sub>で3時間にわたり酸化ストレスを加えた。細胞障害性は培地中に逸脱したLDH活性で表示した。  
\*\*\*\*: p<0.0001.

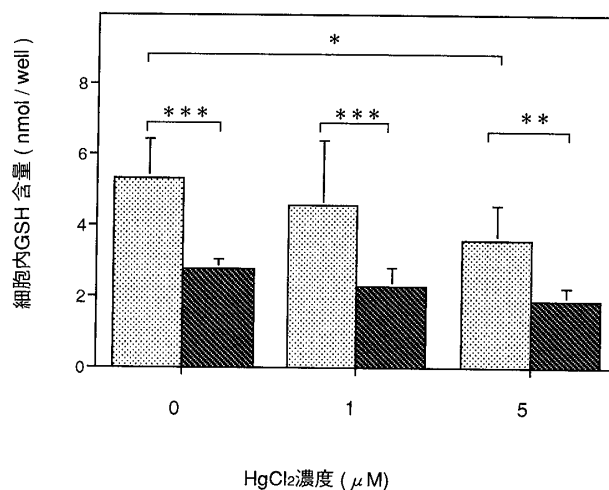


図10 HgCl<sub>2</sub>, BSOによるLLC-PK1細胞のGSH含量の変化  
図9参照。\*: p<0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001.

ことにより, HgCl<sub>2</sub>投与による腎機能障害は軽減した。異なるストレスの前投与により, その後のストレスに対する耐性を獲得したものと推察される。このストレス耐性のメカニズムについて検討した。

HgCl<sub>2</sub>投与という酸化ストレスを加えることによりフリーラジカルが発生し, 更に, フリーラジカルによって障害を受けた細胞が産生するlipid

peroxidation (LPO) をはじめとする代謝産物 reactive oxygen intermediates (ROI) が蓄積してくる<sup>6)</sup>。この際に、CAT, GSH-Px といった抗酸化酵素の活性が上昇し、フリーラジカル、ひいては ROI の効果がこの抗酸化酵素の活性を上回ると腎臓の機能障害、組織障害が進行してくる<sup>7)</sup>。また、HgCl<sub>2</sub> 投与による腎障害は、可逆的なものともいわれている<sup>8)</sup>。代表的細胞防御因子の一つである GSH は、この HgCl<sub>2</sub> の腎臓からの排泄率、並びに蓄積率を決定し、腎臓の障害度を決定してくるといわれる<sup>9)</sup>。また、近位尿細管細胞に GSH を前投与しておくことにより、HgCl<sub>2</sub> による細胞障害が軽減したという報告もある<sup>10)</sup>。

今回、HgCl<sub>2</sub> 投与による腎障害に対し、開腹ストレスによる耐性獲得が酸化還元反応 (redox cycle) のどこから発生してくるものかを明らかにするため、細胞内抗酸化物質である還元型グルタチオン (GSH) に着目し、開腹ストレスを加えた際の腎細胞内 GSH 含量を測定した。腎細胞内 GSH 含量は、コントロールラットに比べ、開腹ストレスを加えると 1 日目、2 日目ともに上昇を認めた。つまり、開腹ストレスというストレスに対して生体の防御機構が作動して、抗酸化物質 GSH が上昇したといえる。GSH が上昇した段階でひきつづき酸化ストレス HgCl<sub>2</sub> を投与したことで、GSH が HgCl<sub>2</sub> 投与からくる ROI の活性に抵抗を示し、腎障害に耐性を獲得したと結論づけられる。コントロール 1 日目に比較し 2 日目で腎 GSH 含量が減少するという所見については、追試実験においても再現性が認められた。この減少については今後 3 日目、4 日目の経過観察を行い検討する必要があるが、現在のところその理由は不明である。

HgCl<sub>2</sub> 投与による腎臓の細胞障害性と GSH の関連を、近位尿細管継代株 LLC-PK1 細胞を用いて in vitro の実験で検討した。LDH の遊離は細胞外膜の障害によるものであり、不可逆的な細胞の障害性を表す<sup>11)</sup>。LDH の逸脱は、HgCl<sub>2</sub> に誘導される細胞障害と極めて相関性が高く<sup>12)</sup>、また、HgCl<sub>2</sub> による細胞障害に対し感受性も極めて高いといわれている<sup>10)</sup>。Hg<sup>2+</sup> は LDH の活性も阻害す

ると報告されている<sup>12)</sup>。我々の用いた測定系では 10 $\mu$ M 以上の HgCl<sub>2</sub> ではアッセイに干渉を認めたので、in vitro の実験では 5 $\mu$ M 以下の HgCl<sub>2</sub> を用いた。

1, 5 $\mu$ M で HgCl<sub>2</sub> を単独投与した際、LDH の逸脱によっては明らかな細胞障害性の増大は得られなかった。そこで、GSH 合成の律速酵素である  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase の特異的不可逆的な拮抗物質である BSO を投与し、GSH の合成を抑制して GSH を減少させておいた状態で、HgCl<sub>2</sub> 投与による細胞障害度が増強するかどうかを検討した。その結果、BSO で処理することにより 5 $\mu$ M で細胞障害が増大することが確認された。これは BSO で肝細胞<sup>13)</sup>、リンパ球<sup>14)</sup> での酸化ストレス障害を増大するとの報告と一致する。

我々は、開腹ストレスによる腎の GSH 増加を in vitro で再現させるため GSH の前駆体である N-アセチルシステイン (NAC)<sup>8)</sup> を添加し、HgCl<sub>2</sub> に対する抵抗性を検討した。しかし、NAC 自体が、LDH の測定系に干渉し NAC 投与による細胞障害性の減弱の有無を評価しえなかった (データ提示省略)。なお、LLC-PK1 細胞内の GSH 含量は、HgCl<sub>2</sub> 非投与群に対して 1, 5 $\mu$ M の HgCl<sub>2</sub> 投与群では GSH 含量の低下を認め、これは酸化ストレスにより GSH が消費されたためと解釈できる。以上より in vitro の実験系でも、酸化ストレスにより生ずる細胞障害を決定する因子として抗酸化物質 GSH が大きく関与していることが立証された。

次に細胞内抗酸化システムと代表的ストレス反応系である視床下部-下垂体-副腎系との関連を検討した。開腹ストレスでは副腎重量が増加していることより、この内分泌系の活性亢進が考えられる。ラットを  $\alpha$ -ACTH で刺激し副腎から過剰なコルチコステロンが分泌されている状態を作った。妊娠したラットにデキサメサゾン投与すると SOD, CAT, GSH-Px といった抗酸化酵素活性の上昇を刺激すること<sup>15)</sup>、また、副腎の 11- $\beta$  ヒドロキシダーゼ阻害薬であるメチラポンを妊娠ラットに投与すると胎児の肺でサーファクタント、並び

に抗酸化酵素の成熟が遅延すること<sup>16)</sup>が報告され、グルココルチコイドは、抗酸化酵素の上昇を誘発する可能性があることが知られている。本研究では、副腎重量が z-ACTH の投与量に容量依存的に増加したことから、z-ACTH 刺激によるコルチコステロン分泌の容量反応性を持った増加が考えられる。z-ACTH で刺激することで副腎内、腎臓内の GSH 含量はともに上昇した。腎臓の GSH 含量は z-ACTH 10, 40 $\mu$ g/100g 体重により容量反動的に著しい増加を示した。

更に z-ACTH を前投与しておくことにより、HgCl<sub>2</sub>による腎障害の発生を軽減しえた。生体がストレスに遭遇して視床下部-下垂体-副腎系が賦活化されると、生体の防御機構も同時に作動して、生体防御因子の一つ GSH の合成を促進することが示唆された。ストレス、あるいは ACTH 投与により腎 GSH 含量が増加し、ストレス耐性を獲得することについては本報告が初めてである。ACTH 投与によりストレス耐性が再現できることは臨床応用の面で意味深いものと我々は考えている。

腎臓の GSH 含量は肝臓、副腎に比較して低値であると報告されており<sup>17)</sup>、我々の結果と一致している。更に、若年ラットで腎と副腎を比較すると前者は酸化ストレスに対する防御効果が弱いと報告されている<sup>17)</sup>。

副腎は他の組織に比べ非酵素的抗酸化物質 (VitA, C, E, グルタチオン) また、抗酸化酵素 (SOD, CAT, GSH-Px) の発現ないし活性が増加していることは知られている<sup>17)18)</sup>。開腹ストレス、ACTH 負荷による GSH 含量の変動も各臓器により差異が認められ、ストレスに対する防御機構が臓器により異なることが示唆された。

### 結 論

1. 開腹術によるストレスをラットに事前に与えると、HgCl<sub>2</sub> (酸化ストレス) による腎障害の軽減が認められる。

2. 開腹ストレスにより腎臓の GSH 含量は増大した。抗酸化物質 GSH が酸化ストレスの結果生じる ROI の活性を上回った結果、ストレスに対する耐性の獲得をもたらしたと考える。

3. in vitro (培養尿細管細胞) でも細胞内 GSH 含量が酸化ストレスによる障害に影響する因子であることを明らかにした。

4. z-ACTH で刺激すると腎臓、副腎の GSH 含量は増大し、また、HgCl<sub>2</sub>で誘導される腎障害を軽減した。

5. 開腹、ACTH 負荷による GSH の変動には臓器特異性がみられた。

以上より視床下部-下垂体-副腎系の賦活化による GSH の合成促進、それによるストレス耐性を獲得する機序を明らかにした。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました東京女子医科大学第二内科学出村 博教授、並びに、直接御指導いただきました野村 馨講師に深謝いたします。

### 文 献

- 1) **Yu BP**: Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74 : 139-162, 1994
- 2) **Nomura K, Kikuchi C, Ogasawara M et al**: LH and testosterone modulate mercuric chloride-induced acute renal failure in male rats; the implication of stress-induced hypogonadism. *J Endocrinol* 148 : 553-559, 1996
- 3) **Ganote CE, Reimer KA, Jennings RB**: Acute mercuric chloride nephropathy. An electron microscopic and metabolic study. *Lab Invest* 31 : 633-647, 1974
- 4) **Muraoka Y, Itoh F**: Sex difference of mercuric chloride induced renal tubular necrosis in rats. From the aspect of sex differences in renal mercury concentration and sulfhydryl levels. *J Toxicol Sci* 15 : 203-214, 1980
- 5) **Chung AS, Maines MD**: Inhibition of the enzymes of glutathione metabolism by mercuric chloride in the rat kidney; reversal by selenium. *Biochem Pharmacol* 31 : 3093-3100, 1982
- 6) **Gstraunthaler G, Pfaller W, Kotanko P**: Glutathione depletion and in vitro lipid peroxidation in mercury or maleate induced acute renal failure. *Biochem Pharmacol* 32 : 2969-2972, 1983
- 7) **Girardi G, Elias MM**: Mercuric chloride effects on rat renal redox enzymes activities: SOD protection. *Free Radical Biol Med* 18 : 61-66, 1995

- 8) **Girardi G, Elias MM** : Effectiveness of N-acetyl-cysteine in protecting against mercuric chloride-induced nephrotoxicity. *Toxicology* 67 : 155-164, 1991
  - 9) **Girardi G, Elias MM** : Effect of different renal glutathione levels on renal mercury disposition and excretion in the rat. *Toxicology* 81 : 57-67, 1993
  - 10) **Lash LH, Zalups RK** : Mercuric chloride-induced cytotoxicity and compensatory hypertrophy in rat kidney proximal tubular cells. *J Pharmacol Exp Ther* 261 : 819-829, 1992
  - 11) **Lash LH, Tokarz JJ** : Isolation of two distinct populations of cells from rat kidney cortex and their use in the study of chemical-induced toxicity. *Anal Biochem* 182 : 271-279, 1989
  - 12) **Smith MA, Acosta D, Bruckner JV** : Development of a primary culture system of rat kidney cortical cells to evaluate nephrotoxicity of xenobiotics. *Food Chem Toxicol* 24 : 551-556, 1986
  - 13) **Rafeiro E, Barr SG, Harrison JJ** : Effects of N-acetylcysteine and dithiothreitol on glutathione and protein thiol replenishment during acetaminophen-induced toxicity in isolated mouse hepatocytes. *Toxicology* 93 : 209-224, 1994
  - 14) **Lander HM, Dgiste JS, Teng KK et al** : p21 ras as a common signaling target of reactive free radicals and cellular redox stress. *J Biol Chem* 270 : 2195-2198, 1995
  - 15) **Frank L, Lewis P, Sosenko IRS** : Dexamethasone stimulates fetal rat lung antioxidant enzyme activity in parallel with surfactant stimulation. *Pediatrics* 75 : 569-574, 1985
  - 16) **Sosenko IRS, Frank L** : Metyrapone delays surfactant and antioxidant enzyme maturation in developing rat lung. *Pediatr Res* 20 : 672-675, 1986
  - 17) **Azhar S, Cao L, Reaven E** : Alteration of the adrenal antioxidant defense system during aging in rats. *J Clin Invest* 96 : 1414-1424, 1995
  - 18) **DiMascio P, Murphy ME, Sies H** : Antioxidant defense systems ; the role of carotenoids, tocopherols and thiols. *Am J Clin Nutr* 53 : 194 S-200S, 1991
-