

## 한국산 생약으로부터 해독물질의 개발(제3보) 카드뮴으로 처리한 3T3섬유모세포에서 소엽 메탄올 분획의 수복효과

한두석 · 유현경 · 광정숙\* · 백승화\*  
원광대학교 치과대학 구강해부학교실, 자연과학대학 화학과\*

### Development of Antitoxic Agents from Korean Medicinal Plants (Part 3) Repaired Effects of Methanol Fraction of *Perilla Frutescens* on 3T3 Fibroblast Treated with Cadmium

Du Seok Han, Hyeon Gyeong Yoo, Kwak Jung Suk\* and Seung Hwa Baek\*

Dept. of Oral Anatomy, School of Dentistry and

\*Dept. of Chemistry, College of Natural Science, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

(Received July 14, 1995)

(Accepted August 10, 1995)

**ABSTRACT :** This study was carried out to evaluate the cytotoxicity of cadmium on 3T3 fibroblast and to develop the antidote on 3T3 fibroblast which was injured by  $IC_{50}$  of cadmium. The groups for repaired effects were divided into 7 groups such as medium alone treated group, Cadmium treated  $IC_{50}$  groups and 5 experimental groups ( $IC_{50}$  cadmium plus  $10^{-4}$  concentration of each methanol fraction). After incubation for 48 hrs in the same conditions, MTT (tetrazolium MTT), NR (neutral red) and SRB (sulforhodamine B protein) assay were measured. Light microscopic observations were also investigated. The ethyl acetate fraction of *Perilla frutescens* showed significantly repaired effect against cadmium cytotoxicity and this fraction inhibited critical cell regeneration in light microscopy.

**Key Words :** *Perilla frutescens*, Cadmium, SRB assay, Ethyl acetate fraction

## I. 서 론

현대산업의 급속한 발달과 더불어 인구의 증가, 도시화로 인한 생활하수, 생활쓰레기, 농약 및 농축산 폐기물 및 공장폐수, 자동차 배기가스, 공장의 굴뚝 등에서 배출되는 각종 오염 물질로 인하여 수질, 토양, 대기 등의 환경오염은 폭발적으로 늘어나고 있는 추세이다.

환경오염에 조금만 관심이 있는 현대인이라면 무서운 공해병을 유발하는 수은, 납, 카드뮴, 구리 등을 쉽게 연상할 수 있을 것이다.

카드뮴(Cadmium, Cd)은 납이나 이연광산의 광물용해시 생성되는 부산물로서 산업에 사용하는 곳으로는 합금형성이나 전기도금, 페인트, 도자기 염료, 부식방지제, 카드뮴-니켈전지, 살균제 등에 다양하게 쓰여지고 있으며 그 소비량도 산업이 발달함에 따라 증가하고 있는 실정이다(William and Burson, 1985). 카드뮴은

노출되는 양과 형태(Dudley *et al.*, 1982), 흡로기간(Sendelbach *et al.*, 1988) 및 체내유입경로 등에 따라 다양한 독성을 나타내는데 최근에는 카드뮴의 독성을 경감시키는 물질인 아연(Liu *et al.*, 1990; Coogan *et al.*, 1992; Kaji *et al.*, 1994), metallothionein(Beattie *et al.*, 1990; Robson *et al.*, 1992), 구리(Kaji *et al.*, 1992), glutathione(Kang and Enger, 1990; Kelland *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1993), sodium butyrate(Thomas *et al.*, 1991) 및 interleukin(Kondo *et al.*, 1994; Kaji *et al.*, 1993) 등에 대하여 많은 연구가 이루어지고 있고, 또한 이들 물질들의 상호작용(Shopsis, 1994)과 카드뮴과 산도와의 관계(Koizum *et al.*, 1994) 등이 활발히 연구되고 있으나 카드뮴의 해독제로는 아직 사용하지 못하고 있다.

최근에 저희 연구실에서 피부암세포에 대한 소엽 추출액의 항암효과를 조사하여 세포수의 산정, MTT 정량, LDH 활성 및 세포형태를 관찰한 결과 클로르포름

가용성 분획에서 유의한 항암효과가 있다고 보고한 바 있다(한 등, 1994).

중금속 해독물질은 자체 독성이 적고 중금속과의 결합이 용이하거나 중금속과의 결합을 쉽게 할 수 있는 물질을 생체에서 분비하도록 하는 물질이어야 한다(Waalkes 등, 1984). 소엽에는 거의 중독을 해독하는 물질이 함유되어 있을 뿐 아니라 약리작용이 다양하고 중금속 물질의 해독성분인 페놀산(Conn, 1977)이 함유되어 있을 것으로 생각되어 전보(한 등, 1994)에서 소엽의 세포독성을 관찰하여 독성이 가장 적은 추출액으로 밝혀진 메탄올 추출액에서 5종류의 분획을 조제하여 카드뮴  $IC_{50}$ 량과  $10^4$ 농도의 분획을 동시에 처리하여 각 분획의 MTT 정량, NR 정량 및 SRB 정량을 분광광도계를 이용하여 정량분석하고 형태학적 관찰을 실시하여 수복효과를 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) 검액조제

1994년 충남 논산군 광석면에서 구입하여 그늘에서 말린 소엽을 정선한 후 조말하여 약 500 g을 평량하여 수용상에서 MeOH을 3배량 가하여 3시간씩 환류하여 추출한 다음, 이 추출액을 여지로 여과하고 여액을 감압농축하여 흑말 메타놀 추출액 57.93 g을 얻었다. 이것을 물에 현탁한 후, n-hexane으로 수회 반복 추출하고 추출액을 무수망초로 탈수시키고 추출액을 여과한

후 감압 농축시켜서 n-hexane추출물 15.19 g을 얻었다. 계속하여 chloroform, ethyl acetate, n-butanol로 순차적으로 추출하고 위의 방법에 따라 용매를 감압농축하여 chloroform 추출물 7.84 g, ethyl acetate추출물 3.56 g, n-butanol추출물 4.57 g과 잔류하는 수층액기스 14.67 g을 얻었다.

#### 2) 시약

세포배양에 사용한 MEM(Minimum Essential Medium), fetal bovine serum, penicillin G, streptomycin, fungizone시약은 Gibco제 GR급이었으며, MTT 정량과 NR 정량 및 SRB정량에 사용한 시약은 Sigma사에서 구입하였다. 증류수는 3차 증류하여 사용하였다.

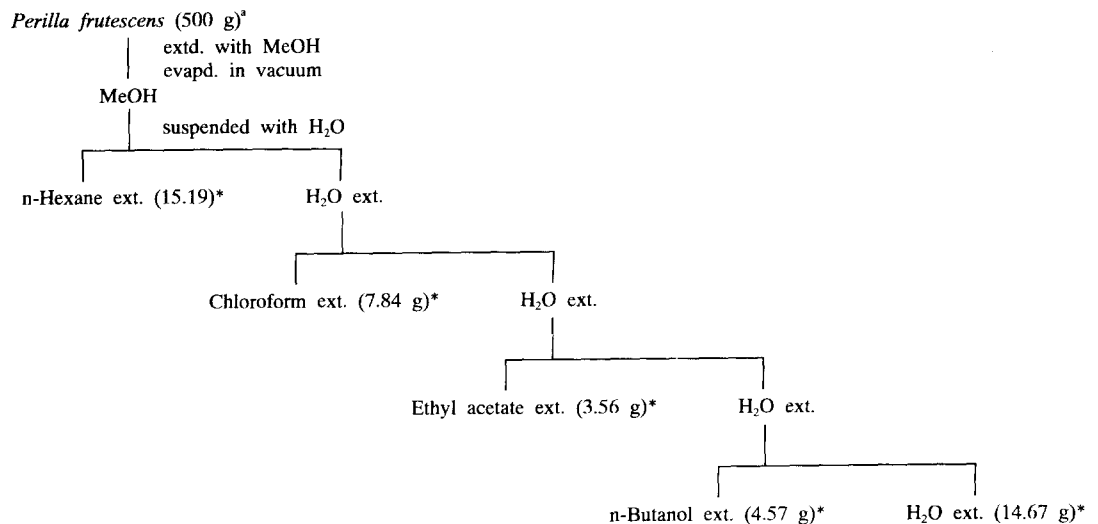
#### 3) 실험기기

세포의 배양은  $CO_2$  incubator(Shellab Co., U.S.A)를 사용하였으며, 세포수의 계산은 Turk형 혈구계산기를 이용하였다. MTT 정량, NR 정량 및 SRB 정량시 사용한 UV-Spectrophotometer는 Pye-Unicam사(Model SP-8-400)제품을 사용하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) 시료의 처리

조제한 시료는 즉시  $4^{\circ}C$  냉장고에 저장하였다가 사용직전에 에칠알콜로 동량 희석하였다. 각각 1:1(ml: g)로 희석한 시료는 실험한 농도에 적합하도록 10배 serial dilution을 하여 모든 분획은  $10^4$ 농도를 실험에



Scheme 1. Fraction of *Perilla frutescens*. \*Yield of extract, <sup>a</sup>Methanol extract of *Perilla frutescens*.

사용하였다.

## 2) 세포배양

3T3 섬유모세포는 세포독성과 수복효과를 측정하기 위하여 배양하였다. 배양액으로는 MEM(Gibco, USA)에 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco, U.S.A)과 penicillin G(25 unit/ml), streptomycin(25 µg/ml) 및 fungizone (0.25 µg/ml)을 넣어 사용하였다.

각 세포의 배양은 온도 37°C, 습도 95%, 탄산가스 농도 5%의 배양기(CO<sub>2</sub> incubator, Shellab, U.S.A)를 사용하였다. 실험을 위하여 일차 배양한 flask의 세포를 0.25% trypsin으로 처리하여 Turk형 혈구계산기를 이용하여 세포수가 5×10<sup>4</sup> cells/ml가 되도록 세포부유액을 만들었다.

## 3) MTT(Tetrazolium MTT)정량

Mosmann(1983)의 방법에 따라 세포를 5×10<sup>4</sup> cell/well이 되도록 조절하여 1 ml 씩 24 well plate에 분주하고 24시간 배양하였다. 3T3 섬유모세포에 대한 카드뮴의 MTT<sub>50</sub>(midpoint inhibition value)농도를 결정하였다. 수복효과 실험은 7개군으로 구분하였는데, 배양액만으로 배양한 군을 대조군, MTT<sub>50</sub>량의 카드뮴과 배양액으로 배양한 군을 MTT<sub>50</sub>군, MTT<sub>50</sub>량과 각각의 소엽메타놀 분획 10<sup>-4</sup>농도를 배양액에 넣어 배양한 군은 실험군으로하여 48시간 동안 배양 완료 후 분석 당일 조제한 MTT(Sigma) 50 µg/ml가 함유된 배양액을 well당 1 ml씩 넣어 3시간 배양하였다. 배양후 배양액을 버리고 dimethylsulfoxide(DMSO)를 2 ml/well씩 넣어 5분간 실온 방치 후 MTT formazan을 용해한 후 분광광도계(550 nm)로 흡광도를 측정하여 MTT<sub>50</sub>군과 비교하였다.

## 4) NR(Neutral red)정량

Borenfreund와 Puerner(1984)의 방법에 따라 세포를 5×10<sup>4</sup> cell/well이 되도록 조절하여 1 ml씩 24 well plate에 분주하고 24시간 배양하였다. 3T3 섬유모세포에 대한 카드뮴의 NR<sub>50</sub> 농도를 결정하였다. MTT정량의 방법과 동일하게 대조군, NR<sub>50</sub>군 및 실험군으로 하여 48시간 동안 배양 완료 후 50 µg/ml의 neutral red (Sigma)를 함유한 배양액을 37°C 어두운 곳에서 overnight시킨 후 well당 1 ml씩 첨가하여 3시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 배양액을 버리고 phosphate buffered saline(PBS)으로 2-3회 세척하고 1% formaldehyde-1% CaCl<sub>2</sub> 0.5 ml/well을 넣어 세포를 고정한 후 1% glacial acetic acid-50% ethanol을 well당 2 ml씩

넣어 15분간 실온에 방치하여 용해소체내에 축적된 NR을 용출하였다. 용출된 NR에 관한 흡광도는 분광광도계(540 nm)로 측정하여 NR<sub>50</sub>군과 비교하였다.

## 5) SRB(Sulforhodamine B protein)정량

Skehan *et al.*(1990)의 방법에 따라 세포를 5×10<sup>4</sup> cell/well이 되도록 조절하여 1 ml씩 24 well plate에 분주하고 24시간 배양하였다. 3T3 섬유모 세포에 대한 카드뮴의 SRB<sub>50</sub> 농도를 결정하였다.

MTT 정량의 방법과 동일하게 대조군, SRB<sub>50</sub>군 및 실험군으로 하여 48시간 동안 배양 완료 후 50% trichloroacetic acid를 well당 1 ml씩 분주하여 4°C에서 1시간동안 배양하였다. 배양 완료 후 배양액을 버리고 5회 세척하고 0.4% sulforhodamine B(SRB)를 200 µl씩 첨가하여 1시간 동안 실온에 방치한 다음 1% acetic acid로 5회 세척하고 완전히 건조하였다. 10 mM tris base[tris(hydroxymethyl)aminomethane]로 bound protein stain을 녹인 후 흡광도는 분광광도계(510 또는 540 nm)로 측정하여 SRB<sub>50</sub>군과 비교하였다.

## 6) 세포의 형태학적 관찰

광학현미경적으로 세포를 관찰하기 위하여 3T3 섬유모세포는 SRB 정량 방법으로 처리한 후 SRB 흡수능을 측정하기 전에 도립현미경(Inverted microscope, Olympus)으로 관찰하였다.

## 7) 통계처리

실험결과의 통계처리는 student's paired t-test에 준하였고, p-value가 0.05 이하일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

## III. 결과 및 고찰

3T3 섬유모세포에 여러농도의 카드뮴을 처리하고, MTT, NR 및 SRB의 흡광도를 측정하여 대조군의 흡광도를 100%로 하여 농도에 따른 흡광도를 비례적으로 산출한 결과, MTT, NR 및 SRB 흡광도는 카드뮴의 농도에 비례하여 감소하였으며, IC(inhibitory concentration)<sub>50</sub>인 MTT<sub>50</sub>은 27.99 microM, NR<sub>50</sub>은 28.31 microM 및 SRB<sub>50</sub>은 54.72 microM이었다(Table 1, 2, 3). MTT<sub>50</sub> 농도와 NR<sub>50</sub> 농도인 27.99 microM과 28.31 microM은 흰쥐 섬유모세포에서 측정한 MTT<sub>50</sub> 농도 60.0 microM과 NR<sub>50</sub> 농도 2.15 microM(정연태 등, 1993)와 같은 흰쥐 섬유모세포의 MTT<sub>50</sub>이 54 microM과 NR<sub>50</sub> 39 microM(이 등, 1993)과 비교할 때 차이가 있었

**Table 1.** The effects of cadmium on the production of MTT for-mazan crystal in 3T3 fibroblast

Concentration of cadmium ( $\mu\text{M}$ )	Absorbance (% of control)	
	Mean $\pm$ S.D. 3T3 Fibroblast	
Control	1.284 $\pm$ 0.268 (100)	
1	1.239 $\pm$ 0.267 (96.50)	
25	0.112 $\pm$ 0.01 (8.72)**	
50	0.082 $\pm$ 0.01 (6.39)**	
100	0.056 $\pm$ 0.007 (4.36)**	

Significantly different from the control: \*\*p < 0.01.

**Table 2.** The effects of cadmium on the neutral red uptake in cultured 3T3 fibroblast

Concentration of cadmium ( $\mu\text{M}$ )	Absorbance (% of control)	
	Mean $\pm$ S.D. 3T3 Fibroblast	
Control	1.506 $\pm$ 0.124 (100)	
1	1.466 $\pm$ 0.199 (97.34)	
25	0.153 $\pm$ 0.012 (10.16)**	
50	0.076 $\pm$ 0.011 (5.05)**	
100	0.071 $\pm$ 0.005 (4.71)**	

Significantly different from the control: \*\*p < 0.01.

**Table 3.** Dose-response effects of cadmium-treated 3T3 fibroblast cells assessed by the SRB assay

Concentration of cadmium ( $\mu\text{M}$ )	Absorbance (% of control)	
	Mean $\pm$ S.D. 3T3 Fibroblast	
Control	1.924 $\pm$ 0.016 (100)	
1	1.915 $\pm$ 0.028 (99.53)	
25	0.777 $\pm$ 0.11 (40.39)**	
50	0.672 $\pm$ 0.048 (34.93)**	
100	0.715 $\pm$ 0.109 (37.16)**	

Significantly different from the control: \*\*p < 0.01.

는데, 이는 세포의 종에 의한 차이인 것으로 추측된다. SRB<sub>50</sub>인 54.72 microM 농도는 섬유모세포에 대한 세포 독성에 관한 연구가 없어 비교할 수 없었으나, MTT<sub>50</sub>과 NR<sub>50</sub>보다 낮게 나타났으며, 실험 결과 표준편차가 적게 나타나는 민감한 분석방법임을 알 수 있었다.

3T3 섬유모세포에 MTT<sub>50</sub> 농도는 27.99 microM의 카드뮴과 5종류의 소엽 메탄올 분획 10<sup>-4</sup> 농도를 동시에 처리하고 MTT 흡광도를 측정하여 MTT<sub>50</sub>군의 흡광도와 비례적으로 산출한 결과 ethyl acetate분획의 81.63%와 n-butanol분획의 67.06%로 유의성 있는 수복효과를 나타냈고(Table 4), 3T3 섬유모세포에 NR<sub>50</sub> 농도인 28.31 microM의 카드뮴과 5종류의 소엽 메탄올 분획 10<sup>-4</sup> 농도를 동시에 처리하고 NR 흡광도를 측정하여 NR<sub>50</sub>군의 흡광도와 비례적으로 산출한 결과 ethyl acetate분획이 59.17%로 유의성 있는 수복효과를 나타냈으며(Table 5), 3T3 섬유모세포에 SRB<sub>50</sub> 농도인 54.72 mi-

**Table 4.** The MTT absorbance on each fraction of *Perilla frutescens* in 3T3 fibroblast treated with cadmium (MTT<sub>50</sub>)

Group \	MTT Absorbance	
	Mean $\pm$ S.D.	(% of control)
Control	1.715 $\pm$ 0.057	100
MTT <sub>50</sub>	0.695 $\pm$ 0.011	40.53
BuOH	1.150 $\pm$ 0.021**	67.06
Chloroform	0.735 $\pm$ 0.008	42.86
Ethyl acetate	1.400 $\pm$ 0.087**	81.63
Hexane	0.860 $\pm$ 0.023*	50.15
H <sub>2</sub> O	0.915 $\pm$ 0.01*	53.35

Significantly different from the MTT<sub>50</sub>: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01.

**Table 5.** The NR uptake ability on each fraction of *Perilla frutescens* in 3T3 fibroblast treated with cadmium (NR<sub>50</sub>)

Group \	NR Absorbance	
	Mean $\pm$ S.D.	(% of control)
Control	1.859 $\pm$ 0.025	100
NR <sub>50</sub>	0.90 $\pm$ 0.035	48.41
BuOH	0.67 $\pm$ 0.014	36.04
Chloroform	0.77 $\pm$ 0.021	41.42
Ethyl acetate	1.10 $\pm$ 0.067*	59.17
Hexane	0.44 $\pm$ 0.005*	23.67
H <sub>2</sub> O	0.82 $\pm$ 0.016	44.11

Significantly different from the NR<sub>50</sub>: \*p < 0.05.

**Table 6.** The SRB absorbance on each fraction of *Perilla frutescens* in 3T3 fibroblast treated with cadmium (SRB<sub>50</sub>)

Group \	SRB Absorbance	
	Mean $\pm$ S.D.	(% of control)
Control	1.863 $\pm$ 0.013	100
SRB <sub>50</sub>	0.750 $\pm$ 0.155	40.26
BuOH	1.007 $\pm$ 0.068**	54.05
Chloroform	1.347 $\pm$ 0.206**	72.30
Ethyl acetate	1.412 $\pm$ 0.229**	75.79
Hexane	1.274 $\pm$ 0.121**	68.38
H <sub>2</sub> O	1.430 $\pm$ 1.43 **	76.76

Significantly different from the SRB<sub>50</sub>: \*\*p < 0.01.

croM 농도의 카드뮴과 5종류의 메탄올분획 10<sup>-4</sup> 농도를 동시에 처리하고 SRB 흡광도를 측정하여 SRB<sub>50</sub>군의 흡광도와 비례적으로 산출한 결과 Table 6에서 보는바와 같이 소엽의 모든 메탄올 분획에서 유의성 있는 수복효과를 나타냈다(P < 0.01).

세포의 광학현미경적 관찰조건에서는 대조군에서는 배양 24시간째부터 배양용기의 바닥에 다수의 방추형의 3T3 섬유모세포들이 부착되어 있었으며(사진 A), IC<sub>50</sub>(MTT<sub>50</sub>, NR<sub>50</sub>, SRB<sub>50</sub>)의 카드뮴을 처리한 군에서는 세포수가 감소되었고, 세포의 형태가 원형으로 변형되는 양상을 보였다(사진 B). IC<sub>50</sub> 농도의 카드뮴과 소엽의 ethyl acetate분획을 처리한 군에서는 IC<sub>50</sub>군에 비하

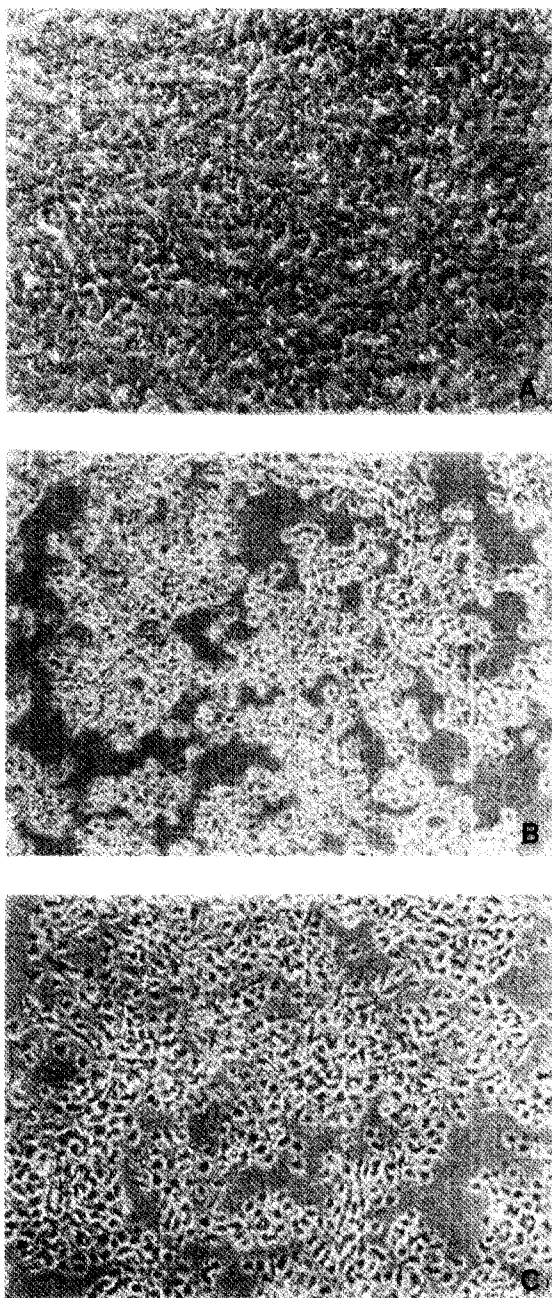


Fig. 1. An inverted photomicrograph of 3T3 fibroblast in control medium (A), cultured for 48 hrs in the  $IC_{50}$  of cadmium (B),  $10^{-4}$  concentration of ethyl acetate fraction (C), C showed regeneration of cell, increase in cell number.

여 세포수가 증가하고 재생현상이 뚜렷하였다(사진 C). 소엽으로부터 분리한 추출액이나 분획을 이용하여 중금속의 해독효과를 측정한 보고가 없어 직접적인 비교는 할 수 없으나, 본 실험의 결과에 의하면 소엽의 메탄올 추출액에서 분리한 ethyl acetate 분획은 카드뮴에 대한 수복효과가 있는 것으로 인정된다.

소엽의 ethyl acetate 가용성 분획에 카드뮴과 킬레이

트 형성에 기여하는 anthocyanin(Jang 등, 1991, Conn, 1977)과 caffeic ester(Nakanishe 등, 1990)나 다른 리간드 화합물이 다른 분획에 비하여 상대적으로 많이 용해되어 있으리라 생각된다. 따라서 에틸아세테이트 가용성 분획을 크로마토그래피법을 이용하여 순수한 리간드 화합물을 분리 분석하고 아울러 카드뮴의 해독물질에 관한 메카니즘과 그 기전을 규명해야 할 중요한 과제의 하나로 생각된다.

#### IV. 결 론

카드뮴이 3T3 섬유모세포에 미치는 세포독성을 검정하고 카드뮴  $IC_{50}$ (MTT $_{50}$ , NR $_{50}$ , SRB $_{50}$ )에 의하여 손상된 3T3 섬유모세포를 수복시킬 수 있는 물질을 창출할 목적으로 본 실험을 시행하였다. 실험은 배양액만으로 배양한 균을 대조군, 세포독성시험에 의하여 결정된  $IC_{50}$  농도의 카드뮴과 5종류의 소엽의 메탄올 분획을 각각 배양액에 넣어 배양한 균을 실험군으로 분류하여 실험하였다. 모든 군은 동일한 조건에서 48시간 배양한 후, MTT 흡광도, NR Uptake 능력 및 SRB 양을 측정하고 광학 현미경적 관찰을 실시하였다. 소엽의 메탄올 추출액중 ethyl acetate 분획이 MTT 정량, NR 정량, SRB 정량에서 유의성 있는 수복효과를 나타냈으며 광학현미경적 소견에서도 ethyl acetate 분획에서 세포의 재생이 뚜렷하였다.

#### 감사의 말씀

이 연구는 1995년도 원광대학교 교내연구비에 의한 결과이며, 이에 감사한다.

#### 참고문헌

- Beattie, J.H., Marion, M., Schmit, J.P. and Denizau, F. (1990): The cytotoxic effects of cadmium chloride and mercuric chloride mixtures in rat primaty hepatocyte cultures. *Toxicology*. **62**(2), 161-173.
- Borenfreund, E and Puerner, J.A. (1984): A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/Nr-90). *J. Tissue Culture Meth.*, **9**, 7-9.
- Chung, Y.T., Park, S.T., Choi., M.K., Kim, J.J., Mun, Y.J., Woo, W.H., Han, D.S., Choi, B.K. and Soh, J.T. (1993): A study on the cytotoxicity of cadmium *in vitro*. *Korean J. Toxicol.* **9**, 45-60.
- Coogan, T.P., Bare, R.M. and Waalkes, M.P. (1992): Cadmium-induced DNA strand damage in cul-

- tured liver cells: reduction in cadmium genotoxicity following zinc pretreatment. *Toxicology and Applied pharmacology*, **113**(2), 227-233.
- Conn, H.J. (1977): Biological stains(The Willinms and Wilkins Co., Baltimore), 458-488.
- Dudley, R.E., Svovoda, D.J., Klaassen, C.D. (1982): Acute exposure to cadmium causes severe liver injury in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **65**, 302-313.
- Jang, H. J., Park, J.Y. and Kim, Y. T. (1991): Volatile components of *Perilla folium*. Korean, *J. Food sci. Technol.* **23**(2), 129-132.
- Kaji, T., Fujiwara, Y., Koyanagi, E., Yamamoto, C., Mishima, A., Sakamoto, M. and Kozuka, H. (1992): Protective effect of copper against cadmium cytotoxicity on cultured vesicular endothelial cells. *Toxicology Letters*. **63**(1), 13-20.
- Kaji, T., Mishima, Aji T., Koyanagi, E., Yamamoto, C., Sakamoto, M. and Kozuka, H. (1992): Possible mechanism for zinc protection against cadmium cytotoxicity in cultured vesicular endothelial cells. *Toxicology*, **76**(3), 257-270.
- Kaji, T., Yamamoto, C., Tsubaki, Ohkawara, S., Sakamoto, M., Sato, M., Kozuka, H. (1993): Metallothionein induction by cadmium, cytokines, thrombin and endothelin-1 in cultured vesicular endothelial cells. *Life Sciences*. **53**(15), 1185-1191.
- Kaji, T., Ohkawara, S., Yamamoto, C., Sakamoto, M. and Kozuka, H. (1994): Transforming growth factor beta-induced tolerance to cadmium cytotoxicity in cultured vesicular endothelial cells. *Toxicology*, **88**(1-3), 69-79.
- Kang, Y.J. and Enger, M.D. (1990): Cadmium cytotoxicity correlates with the changes in glutathione content that occur during the logarithmic growth phase of A549-T27 cells. *Toxicology Letters*. **51**(1), 23-28.
- Kelland, L.R., Mistry, P., Avel, G., Freidlos, F., Loh, S. Y., Roberts, J.J. and Harrap, K.R. (1992): Establishment and characterization of an in vitro model of acquired resistance to cisplatin in a human testicular nonseminomatous germ cell line. *Cancer Res.* **52**(7), 1710-1716.
- Koizumi, T., Yokota, T., Suzuki, K.T. (1994): Mechanism of cadmium-induced cytotoxicity in rat hepatocytes, Cd-induced acidification causes alkalization accompanied by membrane damage. *Biological Trace Element Research*. **42**(1), 31-41.
- Kondo, Y., Kuo, S.M., Lazo, J.S. (1994): Interleukin-1 beta-mediated metallothionein induction and cytoprotection against cadmium and cis-diamminedichloroplatinum. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **270**(3), 1313-1318.
- Li, W., Zhao, Y. and Chou, I.N. (1993): Alterations in cytoskeletal oriteub sulfohydryl and cellular glutathione in cultured cells exposed to cadmium and nickel ions. *Toxicology*. **77**(1-2), 65-79.
- Liu, J., Kershaw, W.C. and Klaassen, C.D. (1990): Rat primary hepatocyte cultures are a good model for examining metallothionein-induced tolerance to cadmium toxicity. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Animal*. **26**(1), 75-79.
- Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63.
- Nakanighi, T., Nishi, M., Inada, A., Obata, H., Tanabe, N. (1990): Two new potent inhibitors of xanthine oxidase from leaves of *Perilla frutescens* Britton Var. *acuta* Kudo. *Japan Chem. Pharm. Bull.* **38**(6), 1772-1774.
- Robson, T., Hall, A. and Lohrer, H. (1992): Increased sensitivity of a chinese hamster ovary cell line to alkylating agents after overexpression of the human metallothionein 11-A gene. *Mut. Res.* **274**(3), 177-185.
- Sendelbach, L.E. and Klaassen, C.D. (1988): Kidney synthesizes less metallothionein than liver in response to cadmium chloride and cadmium-metallothionein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **92**, 95-102.
- Shehan, P., Storeng, S., Studiero, D., Monke, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bodesh, H., Kenny, S. and Boyd, M.R. (1990): New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *National cancer institute*, **82**(13), 1107-1112.
- Shopsis, C. (1994): Antagonism of cadmium cytotoxicity by differentiation inducers. *Cell Biology and Toxicology*. **10**(3), 191-205.
- Thomas, D.J., Angle, C.R., Swanson, S.A. and Caffrey, T.C. (1991): Effect of sodium butyrate on metallothionein induction and cadmium cytotoxicity in ROS 17/2.8 cells. *Toxicology*. **66**(1), 35-46.
- Waalkes, M.P., Hjelle, J.J., Klaassen, C.D. (1984): Transient induction of hepatic metallothionein following oral ethanol administration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **74**, 314-320.
- Williams P.L., Burson J.L. (1985): *Industrial Toxicology*. (eds) Van Nostrand Reinhold, p.197-210.
- 이용주, 유현경, 한두석 (1993): 카드뮴이 백서 배양 섬유모세포와 신경아교세포에 미치는 세포독성에 관한 연구, 대한구강해부학회지, **17**, 63-73.
- 한두석, 정병호, 유현경, 김영옥, 백승화 (1994): 소엽의 세포독성 및 항암작용에 관한 연구. 생약학회지 **25**(3), 249-257.
- 한두석, 유현경, 백승화 (1994): 소엽의 메타놀 분획이 피부암 세포에 미치는 항암 효과. 대한구강해부학회지 **18**(1), 19-28.