



## 흰쥐 신경교종세포에서 카드뮴 세포독성에 대한 키토산의 효과

백용아 · 이정래 · 김강득 · 김혜원 · 이한솔 · 허정무 · 오재민 · 최민규 · 정연태  
원광대학교 의과대학

## Protective Effects of Chitosan on the Cadmium Cytotoxicity in Rat Glioma Cells

Yong-Ah Baik, Jeoung-Rae Lee, Gang-Deuk Kim, Hye-Won Kim, Han-Sol Lee,  
Jung-Mu Hur, Jay-Min Oh, Min-Kyu Choi and Yeun-Tai Chung  
Wonkwang University, School of Medicine, Iksan 570-749, Korea

Received January 9, 2004; Accepted February 2, 2004

**ABSTRACT.** Caspase-3 protease is known as a key role of apoptotic enzyme, and caspase-3 activity is a central event that occurs upstream of DNA fragmentation during apoptosis. This study demonstrates that chitosan pretreatment inhibits cadmium-induced apoptosis by attenuating the activity of caspase-3. We also analyzed the protective effect of chitosan on DNA fragmentation induced by cadmium. Cadmium toxicity was examined by DNA fragmentation and nuclear condensation with Hoechst stain. Caspase-3 activities were increased cadmium treated group for 3 hours compared with control. When chitosan (150 mg/ml) was pretreated at 30 min before cadmium treatment, cadmium cytotoxicity was suppressed in a dose-dependent manner evaluated by DNA fragmentation and caspase activity. From these results, it is suggest that the protective effect of chitosan pretreatment against cadmium-induced cytotoxicity is mediated through inhibition of caspase-3 protease activation and DNA fragmentation.

**Keywords:** Cadmium, Cytotoxicity, Chitosan, Rat glioma cell.

### 서 론

급속한 산업화에 따라 중금속에 의한 환경오염 문제가 날로 심화되어 카드뮴(Cd), 납(Pb), 수은(Hg) 등과 같은 중금속의 피해는 심각한 사회문제로 대두되어(Clausen과 Rostogi, 1977) 인체에 대한 유해 인자로 주목받기 시작한 가운데 우리나라에서도 곡류, 야채류, 과일 등의 작물과 어패류에서 중금속이 검출되었다는 보고(송철, 1976; 김길생, 1981)와 함께 그 심각성은 해를 거듭할수록 증가하고 있다.

카드뮴은 식품, 식수, 공기, 흡연 등을 통하여 체내로 흡수된 후 간이나 신장에 축적되며 일단 흡수되면 생물학적

반감기가 길어 각종 부작용을 초래하는 맹독성 물질로 알려져 있다(Shaikh and Lucis, 1972; Kazantizis, 1979; Morita, 1984). 인간과 동물의 중독 증세로는 만성 중독 증인 Itai-itai syndrome을 비롯하여 체중감소, 빈혈, 간과 신장 등 장기 조직의 생화학적·형태학적 변화, 고혈압, 단백뇨, 골연화증, 중추신경계의 이상이 나타난다(Schroeder and Vinton, 1962; Larsson and Piscator, 1971; Kazantizis, 1979; Morita, 1984; Axelsson and Piscator, 1996). 특히, 소장에서 칼슘의 흡수를 방해하여 혈액 내 칼슘농도를 저하시키고, 뼈 조직 내 칼슘량을 감소시키며, 노와 변으로의 칼슘 배설량을 증가시키는 등 칼슘대사에 지장을 주는 것으로 알려져 있다(Larsson and Piscator, 1971; Kawamura, 1978; Krejs *et al.*, 1983). 카드뮴의 독성기전에 관한 연구는 계속되어 왔으나 아직 미흡한 실정이며, 다만 이 물질이 발암성 환경독성물질이라는 것은 잘 알려진 사실이다. 실제로 카드뮴에 노출된 동물과 카

Correspondence to: Min-Kyu Choi, Department of Anatomy, Wonkwang University School of Medicine, Iksan 570-749, Korea  
E-mail: mkchoi@wonkwang.ac.kr

드름을 취급한 공장의 근로자는 빈혈 발생률이 높으며 (Friberg *et al.*, 1974), 호흡기 계통의 질환을 유발하여 급성폐렴과 호흡기 부종뿐만 아니라(Nordberg, 1972), 심장 혈관계, 골격계 및 신장 질환을 유발 한다(Friberg and Kjellstrom, 1981; Nomiya, 1987). 발생단계에 미치는 영향으로는 golden hamster의 안면부와 상악의 기형 (Ferm과 Carpenter, 1967)이나 생쥐의 사지와 안면부 기형의 원인이 되는 것으로 보고 되고 있다(Layton and Layton, 1979).

한편 카드뮴의 독성에 관한 연구는 *in vitro*에서도 활발히 이루어져 왔는데, 특히 Yamane(1981)는 중금속류의 독성 기전에 관한 연구에서 중금속은 생체에 축적되어 그 독성이 나타나므로 중금속이 축적되는 장소와 그 농도를 결정하는 것은 독성 기전을 밝히는 중요한 문제라고 제시한 바 있으며, 실제로 신장세포(Jin and Nordberg, 1986), 혈액세포(Kunimoto and Miura, 1988), 고환간질세포(Koizumi and Waalkes, 1990), 간세포(Beattie *et al.*, 1987) Chinese hamster ovary 세포(Yuan *et al.*, 2000) 등이 카드뮴에 영향을 많이 받는 것으로 알려져 있다.

지금까지 밝혀진 카드뮴의 독성작용으로는 세포내 metallothionein 합성의 저해(Hussain *et al.*, 1987), thiol 단백질의 변성(Li *et al.*, 1993), 에너지 대사의 저해(Muller, 1986), DNA 구조 변화(Coogan *et al.*, 1992) 및 막구조 변화(Shukla *et al.*, 1987) 등이 밝혀져 있다.

최근 카드뮴에 의해 생성된 활성산소종이 산화적 손상을 통한 아포토시스를 유도한다는 실험적 증거가 보고 되고 있고(Maria *et al.*, 1998), 세포의 산화적 손상에 의해 유도되는 것으로 알려진 노화, 암, 파킨슨씨병이나 치매와 같은 중추신경계 질환에서도 아포토시스를 통한 세포의 죽음이 관찰됨에 따라 퇴행성 질환의 발생 및 진행과정과 아포토시스의 연관관계를 밝히려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 이들 유전자들의 발현이 활성산소종들에 의해 영향을 받는 것으로 보고 되고 있고, 또한 활성산소종은 적당한 농도에서 세포내 신호전달을 개시한다는 연구결과들이 발표되었다(Nath *et al.*, 1996; Hultberg *et al.*, 1998).

키토산은 화학적으로는 글루코사민의 여러 분자가 결합하여 이루어져 있는 고분자 물질로써(글루코사민이 약 5000 이상 결합한 것) 화학적 처리나, 효소처리를 통해 키틴에서 아세틸기를 빼 버려 글루코사민(Glucosamine)으로 된 것으로, 키토산은 체내에 유입된 후 위장을 통과하여 소장과 대장을 통해 배설된다. 이 과정에서 음식물 중에 포함된 발암성 물질, 지방, 콜레스테롤 등이 배설되며 소/대장에 축적된 기존의 숙변들을 제거 시켜 혈액이 항상성을 되찾게 되고, 면역기능 강화, 백혈구 증식 등의

효과가 보고 되어 있다.

중금속 독성에 관한 *in vivo* 실험은 많으나 신경세포를 이용한 *in vitro* 실험은 거의 없기 때문에 본 실험에서 신경교종세포주인 C6-glioma 세포에서 카드뮴 중독에 의한 세포고사 기전을 밝히고, 키토산을 전처리 하였을 경우 카드뮴에 의한 세포독성 완화효과를 조사하고자 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 실험에 사용한 흰쥐 C6-glioma 세포는 ATCC사(U.S.A)로부터 구입하여 사용하였고, 카드뮴을 비롯한 대부분의 시약은 Sigma사(St. Louis, MO)로부터 구입하였으며, 키토산은 익산대학으로부터 제공받아 사용하였다.

### 세포배양 및 시약처리

흰쥐 C6-glioma 세포는 CO<sub>2</sub> 세포배양기에서 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) 10% fetal bovine serum(FBS: PAA Laboratories, Austria)이 포함된 DMEM(Gibco BRL Co, Gaithersburg, MD) 배지에서 배양하였다. 48시간 주기로 DMEM 배양액을 교체하며, 성장안정기에 있는 세포에 카드뮴을 처리한 뒤 세포독성을 측정하였으며, 키토산 전처리에 의한 카드뮴 독성의 경감 효과를 조사하였다.

카드뮴(Sigma Co, St. Louis, MO)은 100 µM/ml씩 증류수에 녹여 냉장 보관하였고, 사용시 DMEM에 희석하여 사용하였다. 키토산은 10 mg/ml씩 0.1% 초산에 녹여서 사용하였다.

### 세포 생존율 측정

세포활성도는 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay를 이용하였다. 세포배양판(24-well plate)에 세포를 분주한 후 CO<sub>2</sub> 세포배양기 안에서 안정화시키고, 여러 실험조건의 세포에 MTT (Sigma, St. Louis, MO)를 100 µg/ml씩 첨가하였다. 4 시간 후 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 formazan의 검출은 MTT가 들어있는 배양액을 모두 버리고, isopropanol 500 µl를 넣고, 약 5분 후에 96-well plate에 200 µl를 넣어, ELISA 분석기로 595 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

### Caspase-3 활성도 측정

C6-glioma 세포(2×10<sup>6</sup>)를 4°C에서 15분 동안 lysing buffer(1% Triton X-100, 0.32 M sucrose, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 2 mM dithiothreitol(DTT), 10 mM Tris/HCl, pH 8.0)에서

용해하고 20,000×g로 15분 동안 원심분리시킨다. 원심 분리하여 얻은 세포부유액은 BCA (bicinchoninic acid) 법으로 정량하여 분석완충용액(100 mM HEPES, 10% sucrose, 0.1% Chaps, pH 7.5, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 2 mM DTT)에 희석된 형광표지된 기질(DEVD-AMC)과 37°C에서 30분간 반응시킨 후 fluorometer(Molecular Devices Co, Sunnyvale, CA)로 측정하였다. 이때의 파장은 excitation wavelength (380 nm)와 emission wavelength(460 nm)를 사용하였다. Fluorogenic substrate인 7-amino-4-coumarin(AMC)-DEVD(Calbiochem Co, San Diego, CA) 50 µM을 사용하여 이들의 proteolytic cleavage를 측정하여 caspase-3 활성을 결정하였다.

#### DNA 추출 및 전기영동

DNA 분절현상을 알아보기 위한 genomic DNA 추출은 Wizard Genomic DNA kit(Promega Co. Wisconsin Medicine, WI)를 이용하였다. DNA 5 µg을 1.5% agarose gel에서 전기영동(50 V, 2시간)을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV등 하에서 DNA 분절을 관찰하였다.

#### LDH Assay

Lactate dehydrogenase(LDH) release assay는 세포막 독성을 측정할 수 있는 colorimetric 방법으로 세포막이 손상된 세포는 LDH를 배지로 방출한다. 방출된 LDH에 colorless tetrazolium salt를 넣으면 환원된 형태의 colored formazan을 형성하는데 이 흡광도를 측정하여 LDH의 활성도를 결정할 수 있다. 다양한 농도의 카드뮴을 처리한 세포의 배지만을 추출하여 tetrazolium salt를 넣고 이 때 형성된 formazan을 ELISA reader에서 490~492 nm 필터를 이용하여 측정하였다.

#### Hoechst Stain

세포 배양판에 카드뮴을 50 µM/ml을 처리한 후 10시간 동안 배양한 후 PBS로 세척하였다. 고정액 (paraformaldehyde 4%)으로 4°C상에서 5분 고정한 후, 다시 PBS로 세척하였다. Hoechst 33258로 3시간 동안 염색한 후 형광현미경으로 관찰하였다.

#### Western Blotting

Bcl-2 family의 발현양상을 살펴보기 위한 western blotting은 C6-glioma 세포( $2 \times 10^6$ )를 4°C에서 15분 동안 TEN-T buffer(150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10 mM Tris(pH 7.4), 5 mM EDTA(pH 8.0), 1 mM PMSF,

1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin)에서 용해시키고 13,000×g로 원심분리시킨다. 12% SDS-polyacrylamide gel에 시료를 전기영동 한 후 nitrocellulose filter로 transfer시킨다. 그리고 5% skim milk로 2시간 blocking한 후 1 : 1000으로 희석한 일차항체(rabbit bcl-2, bad, santacruz Co.)를 1.5시간 처리하고 pH 7.4 TBS-T buffer(0.1 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl, 0.5% Tween-20)로 세척한다. 1 : 1000으로 희석한 이차항체(rabbit HRP, santacruz Co.)를 1.5시간 처리하고 세척한 후 enhanced chemiluminescence(ECL) kit로 반응시키고 필름에서 확인하였다.

## 결 과

#### 카드뮴이 세포의 생존율에 미치는 영향

본 실험에서는 먼저 카드뮴이 세포 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위해 카드뮴의 농도를 변화시키며 18시간 뒤 치사도를 MTT 분석에 의하여 측정하였다. 카드뮴 10 µM 이하의 농도에서는 C6-glioma 세포의 생존율에 변화가 없었고, 50 µM의 카드뮴을 처리한 후 18시간 뒤 생존율이 대조군의 50%로 감소하였으며, 70 µM 처리군과 80 µM 처리군에서는 대조군에 비하여 각각 30% 및 20%만 생존하여 현저하게 감소하였다(Fig. 1).

또한, 카드뮴에 의한 세포손상에서 각각의 농도별로 LDH release를 측정한 결과 50 µM까지는 대조군과 차이가 없었다(Fig. 2).

이 결과로 볼 때 카드뮴 50 µM을 세포에 처리한 후 18시간 후에 세포의 죽음은 피사에 의한 죽음보다는 아포토시스에 의한 죽음일 가능성이 높다. 따라서 좀더 확실하게 아포토시스에 의한 세포의 손상임을 판명하기 위해서,

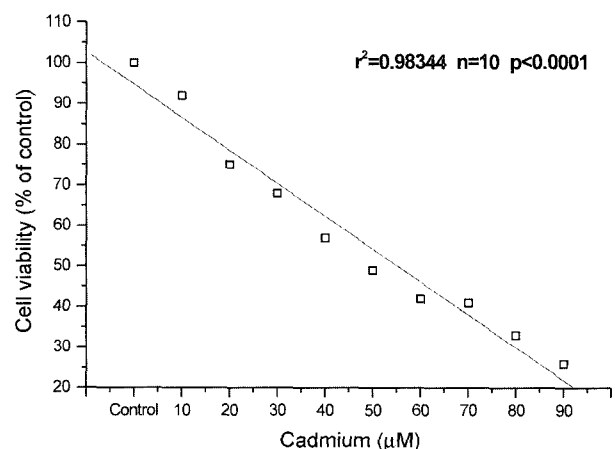
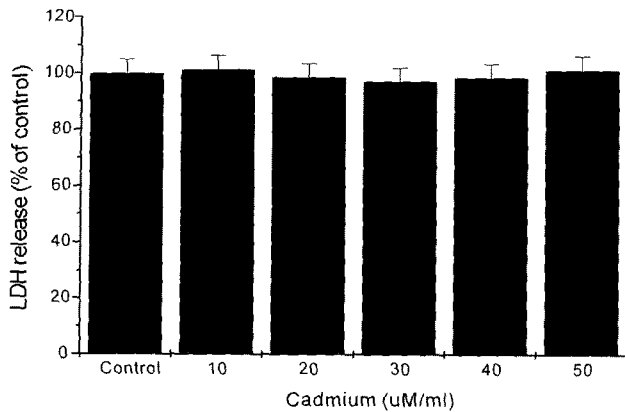
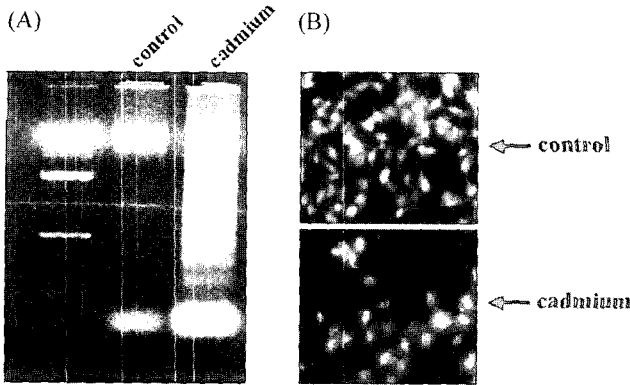


Fig. 1. Effect of cadmium on viability of C6-glioma cells 18 hrs after treatment.



**Fig. 2.** The cells were treated with various concentrations of cadmium for 18 hrs. LDH release were not changed from 10 μM to 50 μM compared with control.



**Fig. 3.** DNA fragmentation and chromatin condensation by agarose gel electrophoresis (A), and Hoechst staining (B). It shows severe DNA fragmentation (A) and chromatin condensation (B) by 50 μM of cadmium treatment for 6 hrs.

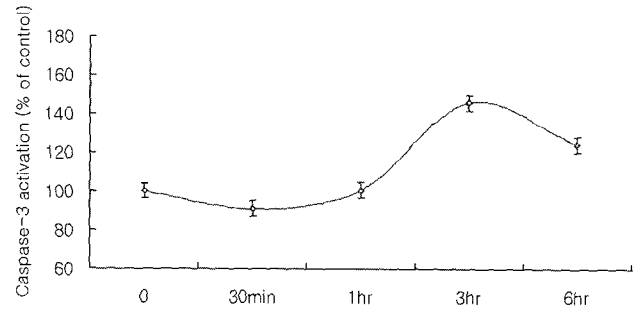
DNA 손상과 핵의 분절현상을 살펴보았다. 그 결과 카드뮴 50 μM을 6시간 처리한 세포에서 DNA 손상과 핵의 분절 현상이 관찰되었다(Fig. 3).

**카드뮴이 Caspase-3 활성화에 미치는 영향**

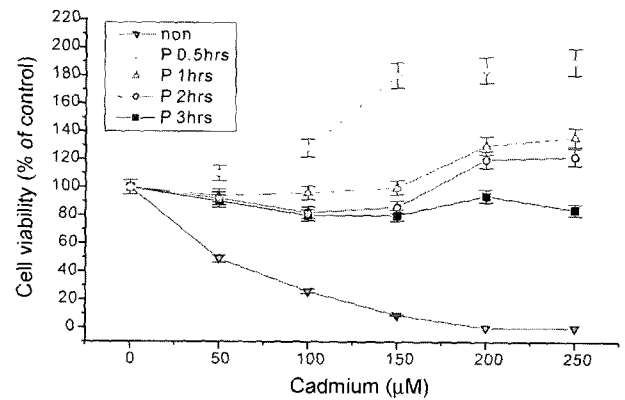
카드뮴 처리에 의한 아포토시스가 caspase-3의 활성화와 관계가 있는지를 확인하기 위해서 caspase계 cysteine 인 caspase-3 cysteine protease(DEVD-specific cystein protease) 활성 정도를 조사하였다(Fig. 4). C6-glioma 세포에 카드뮴 50 μM을 30분, 1시간, 3시간 및 6시간 동안 처리하여 시간별로 조사한 caspase-3의 활성은 1시간 이후부터 급격히 증가하기 시작하여, 3시간 후 최고치를 보였고, 6시간 후에는 활성도가 감소하였다.

**키토산의 전처리에 의한 카드뮴 독성의 영향**

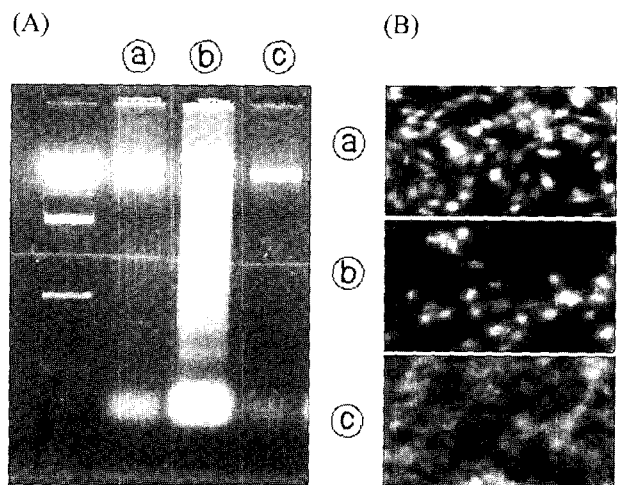
카드뮴에 의한 세포독성에 키토산 전처리가 미치는 영



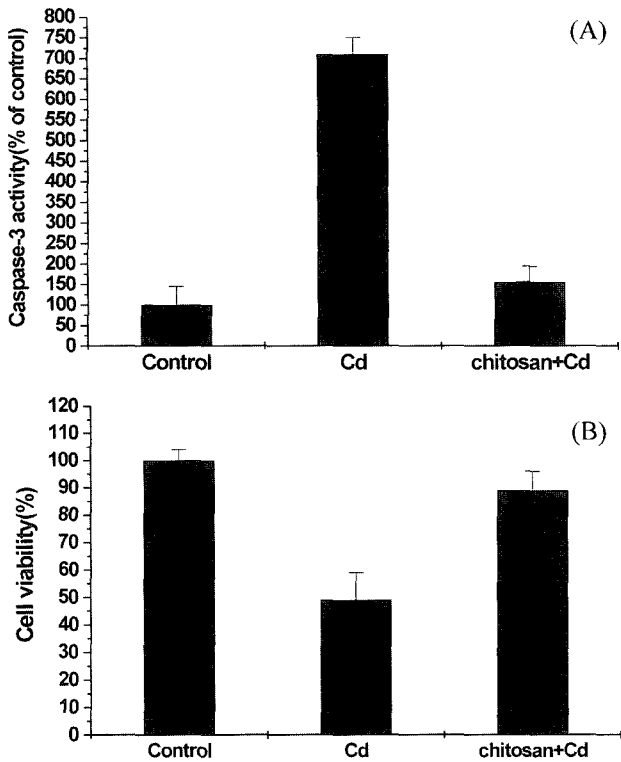
**Fig. 4.** Caspase-3 activity in C6-glioma cells by cadmium treatment. Caspase-3 activity was significantly increased in time dependent manner.



**Fig. 5.** Effect of chitosan on viability of C6-glioma cells against cadmium induced cytotoxicity. It shows decreased cadmium induced cytotoxicity by chitosan. Results were expressed by the mean and standard error (n = 6). P : pre-treatment time.



**Fig. 6.** DNA fragmentation and chromatin condensation by agarose gel electrophoresis (A), and hoechst staining (B). It shows recovered DNA fragmentation (A) and chromatin condensation (B) by chitosan pretreatment. a : control, b : cadmium, c : chitosan + cadmium treated group.



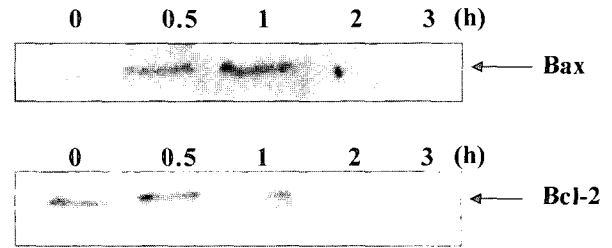
**Fig. 7.** Changes of caspase-3 activity (A) and cell viability (B). Caspase-3 activity was decreased in chitosan pretreatment and cadmium treated group than cadmium treatment only (A). Cell viability shows increased in number in chitosan pretreatment and cadmium treated group than those of cadmium treatment only (B). Results were expressed by the mean and standard error (n = 6).

향을 알아보기 위하여, 키토산을 시간별로 전처리하였다. 그 결과, 키토산을 30분 전에 전처리한 경우에서 카드뮴에 의한 세포 독성을 완화시켰으나, 1시간, 2시간 그리고 3시간 전에 키토산을 전처리 한 군에서는 세포독성 완화에 큰 영향을 미치지 못하는 듯하였다. 또한 카드뮴을 전처리한 후 키토산을 처리한 경우와 동시에 처리한 경우에는 세포독성을 완화시키지 못하였다(Fig. 5).

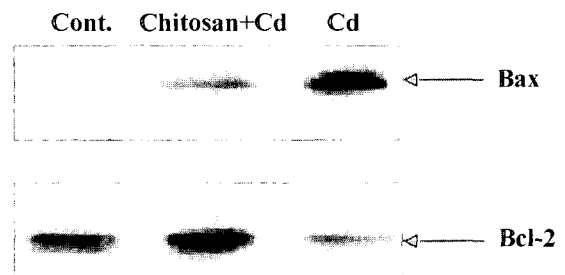
키토산을 30분전에 전처리한 경우의 세포독성 억제효과를 카드뮴 단독 처리한 경우와 비교해본 결과, DNA 손상과 핵의 분절을 억제시켰다(Fig. 6). 또한 caspase-3의 활성에서도 카드뮴에 의한 caspase-3의 활성 증가를 키토산 전처리 효과에 의해서, 대조군과 거의 유사한 수준으로 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 7).

**Bcl-2 family의 활성 측정**

카드뮴에 의한 세포독성이 bcl-2 family에 어떠한 영향을 미치는지 살펴보았다(Fig. 8). 그 결과 카드뮴 단독 처리시에는 bcl-2의 발현이 점차 감소하는 반면에, bax의



**Fig. 8.** Bcl-2 family expression was measured by Western blotting. These data showed increment of bax expression and decrement of Bcl-2 expression by cadmium treatment within 1 hr.



**Fig. 9.** Bcl-2 family expression was measured by Western blotting after treated with cadmium (Cd) for 1 hr and chitosan pretreatment for 30 min.

발현이 점차 증가하는 것을 볼 수 있었다. 키토산 30분 전처리에 의한 카드뮴의 세포독성 완화에서는 bcl-2의 발현이 대조군과 유사하게 발현되었으며, bax의 발현이 감소되는 것을 볼 수 없었다(Fig. 9).

**고 찰**

신경교종세포인 C6-glioma 세포에 카드뮴 50 μM을 처리한 후, 18시간 이후에 세포수의 절반이 감소되었다. 이러한 세포의 손상이 괴사에 의한 세포의 죽음인지 아포토시스에 의한 죽음을 밝히고자 본 연구를 시행한 바, 아포토시스로 밝혀져, 이는 최근의 여러 보고(Azzouri *et al.*, 1994; Beyersmann and Hechtenberg, 1997)들의 내용과 일치하였다. 아포토시스에 의한 세포의 죽음을 확인하기 위하여, DNA fragmentation과 핵의 분절현상 그리고 LDH release를 측정하였다. 그 결과 DNA fragmentation과 chromatin condensation이 나타났다. 또한 LDH release가 변화하지 않으므로, 이는 카드뮴에 의한 세포의 죽음이 괴사에 의한 것이 아니라, 아포토시스에 의한 것임을 알 수 있었다. 이는 Habeebu *et al.* (1998)의 보고와 일치한다.

아포토시스의 유도자로서 caspase-3의 활성이 널리 알려져 있고(Akasaka *et al.*, 2000), 카드뮴에 의한 세포독

성에서도 caspase-3의 활성을 통해서 아포토시스가 유도되는지를 살펴본 결과, caspase-3를 통하여 아포토시스를 유발하였음이 증명되었다. 이는 Yuan *et al.*(2000)의 보고에서 카드뮴에 의한 세포독성은 caspase-3의 활성을 통하여 아포토시스를 유발한다는 것과 일치한다. 아포토시스로의 진행 단계 중에서 초기에 사립체에서 발생하는 현상으로 cytochrome c의 발현과 bad 및 bax가 발현됨이 알려졌다(Scatena *et al.*, 1998), 카드뮴에 의한 세포독성에서도 초기에 bcl-2의 발현이 감소되고, 그 반면에 bad와 bax의 발현이 증가하는 것이 관찰되어, 사립체 내의 효소들에 영향을 미쳐 아포토시스를 유발하는 것으로 생각되나, 이에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한, 카드뮴에 의한 C6-glioma 세포에서의 세포죽음은 bcl-2 family의 mitotic phosphorylation에 의해서 bax 그리고 cytochrome c가 증가되고, 그 후에 caspase-3가 활성화되어, DNA fragmentation을 유발시켜서 아포토시스를 초래하는 것으로 추정된다.

지금까지 중금속의 해독작용에 대하여 많은 연구가 이루어져 왔으며, 중금속과 결합하여 착화물을 형성함으로써 독성을 경감시키려는 시도들이 많았고, 키토산도 그러한 물질중의 하나이다. 체내에서 중금속들이 키토산과 결합하여 체외로 배출됨으로써 체내의 중금속 축적을 억제시킨다는 보고(김용무와 최규석, 1985)를 토대로 이러한 효과를 관찰하였다. 본 실험에서, 카드뮴 처리된 키토산을 시간별로 전처리 한 결과, 1시간에서 3시간 전처리군에서는 카드뮴에 의한 세포의 손상을 억제시키는 효과가 30분 전처리군보다 적었다. 또한 키토산을 30분 전에 전처리한 세포에서는 대조군에 비하여 세포의 생존율에 있어서 현저한 증가를 보였다. 이러한 결과는 키토산이 중금속과 결합하여 독성이 적은 착화물을 생성하는 것으로 생각되고, 이에 대하여는 계속적인 연구를 필요로 한다. 키토산을 30분 전처리한 후, 카드뮴을 처리한 결과, 카드뮴에 의한 세포손상을 억제시켰으며, 카드뮴의 단독 처리군에서 나타나는 pro-apoptotic bcl-2 family인 bad의 발현이 억제되었고, anti-apoptotic bcl-2 family인 bcl-2의 발현이 대조군과 유사하게 나타났다. 그리고, caspase-3의 활성이 억제되었고, DNA fragmentation 또한 나타나지 않았다. 이는 Chu *et al.*(1999)이 보고한 카드뮴의 세포독성에 대하여 아연이 해독작용이 있다는 보고와 일치하여 상기와 같은 독성 경감효과가 있을 것이라는 추측을 뒷받침 한다.

이러한 결과를 종합하여 볼 때, 세포내에서 키토산은 카드뮴에 의한 세포독성의 신호전달 기전인 bcl-2 family mitotic phosphorylation에서 bad, bax 및 cytochrome c의 발현을 억제시키는 조절 기능을 하여, 세포독성을 완

화시키는 것으로 생각되며, 키토산이 세포 내로 유입되어 세포독성을 완화시키지는 명확하지 않지만, 카드뮴과 키토산이 결합하여 독성완화 효과를 보인 것으로 생각되며 자세한 기전은 추후 계속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 감사의 말씀

이 논문은 2002년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- 김길생 (1981): 야채 및 과실류중의 미량 금속에 대한 연구. 국립보건연구원보 **18**, 363-367.
- 김용무, 최규석 (1985): Chitosan 유도체계 Chelating Polymers의 합성 및 그 금속이온들의 흡착특성에 관한 연구. 한국고분자학회지 **9**, 417-434.
- 송철 (1976): 식품중 유해성 미량금속에 대한 연구. 국립보건연구원보 **13**, 249-255.
- Akasaka, Y., Ishikawa, Y., Ono, I., Fujita, K., Masuda, T., Asuwa, N., Inuzuka, K., Kiguchi, H. and Ishii, T. (2000): Enhanced expression of caspase-3 in hypertrophic scars and keloid: induction of caspase-3 and apoptosis in keloid fibroblasts *in vitro*. *Lab. Invest.*, **80**, 345-357.
- Axelsson, B. and Piscator, M. (1996): Renal damage after prolonged exposure to cadmium. An experimental study. *Arch. Environ. Health*, **12**, 360-373.
- Azzouri, B.E., Tsanaris, G.T., Pellegrini, O., Manuel, Y., Benveniste, J. and Thomas, Y. (1994): Cadmium induced apoptosis in a human T cell line. *Toxicology*, **88**, 127-139.
- Beattie, J.H., Marion, M. and Denizeau, F. (1987): The modulation by metallothionein of cadmium-induced cytotoxicity in primary hepatocyte cultures. *Toxicology*, **44**, 329-339.
- Beyersmann, D. and Hechtenberg, S. (1997): Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **144**, 247-261.
- Chu, W.A., Moehlenkamp, J.D., Bittel, D., Andrews, G.K. and Johnson, J.A. (1999): Cadmium-mediated activation of the metal response element in human neuroblastoma cells lacking functional metal response element-binding transcription factor-1. *J. Biol. Chem.*, **274**, 5279-5284.
- Clausen, J. and Rostogi, S. (1977): Heavy metal pollution among autoworkers. I. Lead. *Br. J. Indus. Med.*, **34**, 208-215.
- Coogan, T.P., Bare, R.M. and Waalkes, M.P. (1992): Cadmium-induced DNA strand damage in cultured liver cells: reduction in cadmium genotoxicity following zinc pretreatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **113**, 227-233.
- Ferm, V.H. and Carpenter, S.J. (1967): Teratogenic effect of cadmium and its inhibition by zinc. *Nature*, **216**, 1123.
- Friberg, L., Piscator, M., Nordberg, G.F. and Kjellstrom, T. (1974): Cadmium in the environment. (2nd Ed) CAC Press, Cleveland, OH.
- Friberg, L. and Kjellstrom, T. (1981): Cadmium : Bronner, F.

- and Coburn J.W. (eds.), In "Disorder of Mineral Metabolism", Academic Press Inc., New York, pp. 318-334.
- Habeebu, S.S.M., Liu, J. and Klaassen, C.D. (1998): Cadmium-induced apoptosis in mouse liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **149**, 203-209.
- Hultberg, B., Andersson, A. and Isaksson, A. (1998): Alterations of thiol metabolism in human cell lines induced by low amounts of copper, mercury or cadmium ions. *Toxicology*, **126**, 203-212.
- Hussain, T., Ali, M.M. and Chandra, S.V. (1987): The combined effect of  $Pb^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  on monoamine uptake and  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase in striatal synaptosomes. *J. Appl. Toxicol.*, **7**, 277-280.
- Jin, T. and Nordberg, G.F. (1986): Cadmium toxicity in kidney cells. Resistance induced by short term pretreatment *in vitro* and *in vivo*. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **58**, 137-143.
- Kawamura, J. (1978): Disturbances in kidney functions and calcium and phosphate metabolism in cadmium-poisoned rats. *Nephron*, **20**, 101-110.
- Kazantizis, G. (1979): Renal tubular dysfunction and abnormalities of calcium metabolism in cadmium workers. *Environ. Health Perspect.*, **28**, 155-159.
- Koizumi, T. and Waalkes, M.P. (1990): Effects of zinc on the binding of cadmium to DNA : Assessment with testicular interstitial cell and calf thymus DNAs. *Toxicol. In Vitro*, **4**, 51-55.
- Krejs, G.J., Nicar, M.J., Zerwech, J.E., Norman, D.A., Kane, M.G. and Pak, C.Y. (1983): Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on calcium and magnesium absorption in the healthy human jejunum and ileum. *Am. J. Med.*, **75**, 973-976.
- Kunimoto, M. and Miura, T. (1988): Translocation of cadmium from cytosol to membrane fraction in cadmium-loaded red blood cells of rats. *Toxicol. In Vitro*, **2**, 57-63.
- Larsson, S.E. and Piscator, M. (1971): Effect of cadmium on skeletal tissue in normal and calcium deficient rats. *Isr. J. Med. Sci.*, **7**, 495-498.
- Layton, W.M. Jr. and Layton, M.W. (1979): Cadmium induced limb defects in mice : Strain associated differences in sensitivity. *Teratology*, **19**, 229-235.
- Li, W., Zhao, Y. and Cou, I.N. (1993): Alterations in cytoskeletal protein sulfhydryls and cellular glutathione in cultured cells exposed to cadmium and nickel ions. *Toxicology*, **77**, 65-79.
- Maria, E.F., Svetlana, U. and Gerald, C. (1998): Disruption of the intracellular sulfhydryl homeostasis by cadmium-induced oxidative stress leads to protein thiolation and ubiquitination in neuronal cells. *J. Biol. Chem.*, **273**, 12703-12709.
- Morita, S. (1984): Defense mechanisms against cadmium toxicity I. A biochemical and histological study of the effects of pretreatment with cadmium on the acute oral toxicity of cadmium in mice. *Jpn. J. Pharmacol.*, **35**, 129-141.
- Muller, L. (1986): Consequences of cadmium toxicity in rat hepatocytes: Effects of cadmium on the glutathione-peroxidase system. *Toxicol. Lett.*, **30**, 259-265.
- Nath, R., Raser, K.J., Stafford, D., Hajimohammadreza, I., Posner, A., Allen, H., Talanian, R.V., Yuen, P., Gilbertsen, R.B. and Wang, K.K. (1996): Non-erythroid alpha-spectrin breakdown by calpain and interleukin 1 beta-converting-enzyme-like protease(s) in apoptotic cells: contributory roles of both protease families in neuronal apoptosis. *Biochem. J.*, **319**, 683-690.
- Nomiyama, K. (1987): The chronic toxicity of cadmium; influence of environment and other variables. In Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. 80. Edited by E. C. Fonlkes. Springer-Verlag, Berlin, pp. 101-103.
- Nordberg, G.F. (1972): Cadmium metabolism and toxicity. *Environ. Physiol. Biochem.*, **2**, 121-130.
- Scatena, C.D., Stewart, Z.A., Mays, D., Tang, L.J., Keefer, C.J., Leach, S.D. and Pietenpol, J.A. (1998): Mitotic phosphorylation of bcl-2 during normal cell cycle progression and taxol-induced growth arrest. *J. Biol. Chem.*, **273**, 30777-30784.
- Schroeder, H.A. and Vinton, W.H. Jr. (1962): Hypertension induced in rats by small dose of cadmium. *Am. J. Physiol.*, **202**, 515-518.
- Shaikh, Z.A. and Lucis, O.J. (1972): Cadmium and zinc binding in mammalian liver and kidneys. *Arch. Environ. Health*, **24**, 419-425.
- Shukla, G.S., Hussain, T. and Chandra, S.V. (1987): Possible role of regional superoxide dismutase activity and lipid peroxide levels in cadmium neurotoxicity: *in vivo* and *in vitro* studies in growing rats. *Life Sci.*, **41**, 2215-2221.
- Yamane, Y. (1981): Toxicology aspects of environmental pollutants. Faculty of Pharmaceutical Sciences. Chiba University. pp. 1-7.
- Yuan, C., Kadiiska, M., Achanzar, W.E., Mason, R.P. and Waalkes, M.P. (2000): Possible role of caspase-3 inhibition in cadmium-induced blockage of apoptosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **164**, 321-329.