

디젤분진의 수용성 추출물에 의한 메탈로치오닌 유전자 발현

박 광 식*, 문 창 규*

동덕여자대학교 약학대학, *서울대학교 약학대학

Expression of Metallothionein mRNA in Diesel Exhaust Particles Treated A549 Cell

Kwangsik Park* and Chang-Kiu Moon*

College of Pharmacy, Dongduk Women's University #23-1, Wolgok-dong,
Seongbuk-gu, Seoul 136-714, Korea,

*College of Pharmacy, Seoul National University, #56-1, sillim-dong,
Gwanak-gu, Seoul 151-742, Korea

ABSTRACT

Metallothionein gene expression of diesel exhaust particles (DEP) was investigated in human lung epithelial cell line. DEP was collected from diesel motor bus and soluble fraction in water was obtained. Cells, grown to near confluence, were exposed to 5~50 ppm DEP for 6 hours. Regarding the metallothionein gene expressions, MT-1 and MT-2 were induced in the DEP-treated cell by using RT-PCR and real-time PCR. However, MT-3 which is known to be brain specific, and another isoform MT-4 were not expressed in cadmium-treated groups as well as control group. Heavy metal of DEP was also analyzed and Zn was found as the major component of heavy metals in DEP used in this study.

Key words : diesel exhaust particulate, metallothionein, human lung epithelial cell

서 론

입자와 가스의 혼합물로 알려진 디젤분진은 수백 종 이상의 서로 다른 유기 및 무기화합물질이 함유되어 있는 것으로 알려져 있으며 서구 유럽, 미국 및 일본에서는 이미 오래전부터 대기환경오염물질로서 그 위해성이 사회적으로 큰 관심이 되어왔다(Kagawa, 2002). 현재 환경부는 대기환경보존법상 먼지의 관리대상을 PM_{2.5} 수준에서 관리하기 위한 방안을 수립 중에 있으며 대개 그 크기가

2.5 μm 이하로 알려진 디젤분진은 향후 관리의 목록에서 가장 중요한 우선순위를 차지하게 될 것으로 평가되고 있다. 지금까지 디젤분진에 대한 유해성에 대해서는 매우 다양한 연구가 이루어져 왔는데 디젤먼지에 존재하는 돌연변이원성 또는 발암원성 물질의 폐암유발에 관한 독성학적 연구 및 역학적 연구가 대표적이라 할 수 있다(Pohjola *et al.*, 2003; Carero *et al.*, 2001; Bungler *et al.*, 2000). 디젤분진의 돌연변이원성 또는 발암성과 관련하여서는 분진 중 함유된 PAHs (Polyaromatic Hydrocarbons)가 그 원인물질로서 알려져 있으며 연소과정중 이들 물질로부터 산화성 및 질산성 PAH 등 다양한 물질이 생성됨으로써 보다 복잡한 독성을

*To whom correspondence should be addressed.

Tel: +82-2-940-4522, E-mail: kspark@dongduk.ac.kr

발현하게 되는 것으로 보고되고 있다(Scheepers *et al.*, 1992). 이외에도 디젤분진에 의한 독성영향으로는 악취, 안자극, 폐기능 저하, 세포사멸, 정자생성기능 저하, 정자의 운동성 저하 등의 내분비계장애, 활성산소생성으로 인한 염증반응 등 매우 다양한 독성현상이 알려져 있다(Marano *et al.*, 2002; Hiura *et al.*, 2000, 1999; Watanabe *et al.*, 1999; Salvi *et al.*, 1999). 뿐만 아니라 디젤분진은 심혈관계 및 심근에도 영향을 미쳐 말초혈관에서의 혈전생성을 증가시키거나 심장근육세포에 손상을 미치는 것으로 보고되었다(Nemmar *et al.*, 2003; Kodavanti *et al.*, 2003). 그러나 아직까지 디젤분진에 의한 중금속독성영향의 지표로서 메탈로치오닌 유전자 발현과 관련된 연구결과는 보고된 바 없다.

메탈로치오닌(Metallothionein, MT)은 분자량 약 7KDa 이하의 저분자 단백질로서 Zn, Cu, Cd 등 중금속과 쉽게 결합하며 포유류의 경우 약 61~68여 개의 구성 아미노산 중 18~23개 정도가 cystein이 차지하고 있고 방향족환 아미노산이나 히스티딘을 함유하지 않는 특징을 갖고 있다. MT는 다양한 isoform이 발견되었으며 포유류 중에 가장 널리 분포하는 MT-1과 MT-2는 여러 종류의 중금속, 약물, 염증반응 매개체 등에 의해 유도된다(Coyle *et al.*, 2002; Schmidt *et al.*, 1985; Lambert *et al.*, 1996). MT-3는 주로 뇌에서 발견되며 신경세포의 성장을 억제하는 특징을 갖고 있다(Palmiter *et al.*, 1992). MT-4에 대해서는 아직 그 기능이나 특성에 대해 알려진 바가 많지 않다. MT는 중금속에 의해 유도되는 단백질이면서도 중금속과 결합하여 본질적으로 중금속의 독성을 완화하는 기능을 갖고 있으며

로 MT자체가 생체내 기능에 어떤 부정적인 작용을 갖거나 나타낼 것으로는 사료되지 않는다. 지금까지의 연구결과로 보아 중금속에 노출되지 않은 세포에 비해 중금속 노출 세포에선 MT가 신속하게 유도되므로 MT의 발현정도를 보아 디젤분진의 중금속의 노출지표로 활용할 수 있을 것으로 사료된다. 특히, 중금속 단일 물질의 노출형태보다는 다매체에 의한 중금속 노출의 현황을 생체내에서 파악하거나 기기분석적 수단으로 측정하기 어려운 극미량농도 수준에서 장기간 만성적으로 노출될 경우 나타날 수 있는 생물학적 영향을 판정하는데 매우 유용할 것으로 판단된다.

본 연구는 디젤분진을 포집하고 수용성 분획을 추출하여 인간 폐포 세포에서의 MT 유전자 발현 패턴을 파악함으로써 향후 중금속을 함유한 복합물질의 위해성평가에 활용될 기초자료를 생산하고자 수행되었다.

재료 및 방법

1. 세포배양

인간폐포의 상피세포에서 유래된 A549는 KCLB (Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 구입하였으며 10% FBS가 함유된 RPMI-1640 배지를 사용하여 5% CO₂와 충분한 습도가 유지되는 37°C 세포배양기에서 배양하였다. 모든 실험은 세포 계대 배양 중 성장기의 세포를 사용하였으며 세포는 25 cm² 크기의 bottle type 배양용기 또는 직경 6 cm의 dish type 배양용기를 사용하였다.

Table 1. Sequences of primers used in the amplification of metallothionein cDNA

Gene (GenBank accession No)	Primer sequence	Product size (bp)
Metallothionein-1 (X76717)	TCCTCCTTGCCCTCGAAATGG TGAATTTATTGCCATTCA	340
Metallothionein-2 (X97260)	ATGGACCCCAACTGCTCGT TCAGGCGCAGCAGCTGCACTT	186
Metallothionein-3 (NM_005954)	TGTGGAGCACTGGAGATAGT TTATGTTCATTCCTCCAAGG	107
Metallothionein-4 (NM_032935)	CACAACCTGCAACTGTAAAA CACTTGTCTGAGCCTCCTT	108
β -actin (BC002409)	GGCGGACTATGACTTAGTTG AAACAACAATGTGCAATCAA	239

2. 디젤분진 추출 및 처리

디젤분진 수용성 추출물은 환경부 '에코테크노피아21'의 '한국형 위해성평가 표준모델 개발'사업의 일환으로 개발된 디젤분진 포집장치로부터 포집된 분진을 적당량의 탈이온수로 현탁시킨 후 60분 정도 Sonication을 두 번 반복하여 수행하고 각각의 액을 혼합하여 원심분리하고 상등액을 동결건조시킨 후 디젤분진량을 2mg 당 1mL의 탈이온수로 용해시켜 0.22 μ m syringe filter로 여과하여 물에 용해되는 물질만을 분리한 것이다.

디젤분진의 세포노출은 아래와 같이 실시하였다. 즉, 배양용기의 바닥을 거의 채울 정도의 일정 세포수가 되면 혈청을 넣지 않은 RPMI-1640 배지로 세척한 후 무혈청 배지에 디젤분진농도가 5, 10, 50 ppm 되도록 가하고 6시간 동안 배양하였다. 사용한 디젤분진의 최고농도에서 배양기간 동안 세포의 형태학적 변화나 괴사는 나타나지 않았다. 각 디젤분진은 동일 농도에 대해 공회 3개씩 처리하였으며 양성대조군으로서 카드뮴 0.1 ppm 농도를 동일 시간 동안 처리하였다.

3. RNA 정제, Primer 선정 및 유전자 증폭

디젤분진 수용성 추출물을 처리한 후 6시간 후에 4°C의 무혈청 RPMI1640 배지로 3회 세척하고 guanidine thiocyanate 용액을 처리하여 세포를 완전 용해 시켰다. 추출된 세포액에 sodium acetate를 넣고 phenol : chloroform : isoamylalcohol 혼합액을 넣고 잘 섞은 후 원심분리한 상등액에 대해 isopropanol 침전으로 total RNA를 분리하였다. 분리한 RNA의 A260/A280은 1.8 이상이었다. PCR에 사용한 메탈로치오닌의 isoform MT-1, MT-2, MT-3, MT-4에 해당하는 프라이머는 기존의 문헌과 미국 국립의학도서관에서 제공하는 GenBank 데이터베이스에서 제공한 사람의 메탈로치오닌 유전자 cDNA 염기서열을 기초로 하여 제작하였으며, 각각의 염기서열은 Table 1에 나타내었다.

역전사반응(RT-PCR)은 RNA 주형 1 μ g에 oligo dT primer, reverse transcriptase 및 각 nucleotide가 함유된 반응액 20 μ L에 대해 42°C로 60분간 실시한 후 94°C에서 5분간 가열함으로써 반응을 종료하였다. 생성된 각 MT isoform의 유전자증폭(PCR)은 RT-PCR에서 얻은 반응생성물 2 μ L와 위에서

기술한 각 프라이머쌍, Taq polymerase 및 각 nucleotide가 함유된 BioneerTM Kit를 사용하여 총 20 μ L의 반응액을 만든 후 95°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분간씩 조절되도록 하여 25회 반응시켰다. 마지막 25회 반응이후에는 최종적으로 72°C에서 15분간 더 증폭시켰다. 각각의 primer 쌍을 이용하여 MT 유전자를 증폭시킨 후 얻은 생성물에 대해서는 1.5% agarose gel 상에서 TAE 완충용액을 사용하여 전기영동하였다(Lee *et al.*, 2002).

Real-time PCR의 경우 역전사반응생성물 0.5 μ L에 대해 실시하였으며 G3PDH를 대조 유전자로 사용하였다. MT-1, MT-2에 대해 PG-RealCyber (PharmacoGenenchips Inc, Korea)를 형광물질로 사용하고, ABI prism 7000 (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 유전자를 증폭시켰으며 MT-1 및 MT-2의 프라이머는 Table 1에 제시된 것과 동일한 프라이머를 사용하였다. PCR 조건은 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분간씩 총 40 cycle을 설정하고 Ct (Threshold Cycle) 값을 산출하였다(Jiang *et al.*, 2004; Pfaffl *et al.*, 2003).

결과 및 고찰

디젤분진은 체내 노출경로에 따라 폐암 뿐만 아니라 신장독성 및 내분비 독성 등 다양한 독성을 발현하는 것이 보고 되었으며 PM2.5의 미세먼지 관리에 있어서 중요한 대상으로 인식되고 있다. 본 연구는 호흡경로로 노출될 경우 발암 및 활성산소를 생성하는 것으로 알려진 디젤분진에 대한 특정 인구집단의 노출수준을 평가할 수 있는 분자생물학적 지표를 탐색하고자 시도되었으며 그 가운데 우선, 디젤분진에 함유되어 있을 가능성이 높은 중금속류에 의한 영향을 평가할 수 있는 지표를 찾는 것을 목표로 수행되었다(Amakawa *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2002; Ishihara *et al.*, 2002).

디젤분진이 함유하고 있는 유해물질의 종류는 분진의 배출원에 따라 매우 다양한 것으로 보고되고 있고, 특히 디젤엔진 자동차의 경우 자동차엔진의 사용연한이나 운전상태의 영향이 큰 것으로 보고된 바 있다(Madden *et al.*, 2003). 본 연구에서는 디젤버스엔진으로부터 포집한 분진을 탈이온수로 추출한 것을 사용하였다. 디젤분진의 노출은 세

포의 형태학적 변화를 일으키지 않는 저농도 수준에서의 영향을 평가하였으며 사용한 디젤분진 5, 10, 50 ppm 농도로 6시간 동안 배양한 세포는 어떠한 형태학적 변화도 관찰되지 않았다. 세포가 손상될 경우 membrane bubble이나, 세포의 위축, 배양용기로부터의 이탈, 세포질의 응축 등 여러 부정적인 소견이 나타나는 데 본 실험에서 사용한 농도의 범위 내에서는 세포 손상과 관련된 특이적인 현상을 관찰할 수 없었다. 본 연구에서의 디젤분진의 농도는 미세분진 총량에 해당하는 양을 나타낸 것이며 실제 사용된 수용액중에 함유된 디젤분진의 농도는 아니다.

인간 세포의 MT cDNA를 근거로 합성한 각 프라이머쌍이 본 연구에서 수행하고자 하는 메탈로치오닌 유전자 발현을 측정하는 데 적절하게 작용하는 지에 대한 실험결과를 Fig. 1에 나타내었다. 실험은 정상대조군과 카드뮴처리 양성대조군으로 나누어 실시하였으며 카드뮴처리군은 0.1 ppm의 카드뮴을 디젤분진과 마찬가지로 6시간동안 처리하였다. MT-1, MT-2의 경우 예상 크기의 DNA단편 340 bp 및 186 bp가 증폭되는 것을 확인할 수 있었으며 정상 대조군에 비해 이들은 카드뮴 처리 양성대조군에서 유전자발현이 증가되는 것으로 보아 본 산물은 메탈로치오닌 유전자가 증폭된 것으로 인정되었다. 그러나 뇌조직에 특이적으로 존재하는 것으로 알려진 MT-3와 메탈로치오닌의 또 다른 isoform인 MT-4의 경우에는 대조군과 카드뮴 처리군에서 모두 유전자 증폭산물을 확인할 수 없었다. MT-3의 증폭산물의 예상크기는 107 bp였으며 MT-4의 경우는 108 bp였다. β -actin의 경우 정상대조군이나 카드뮴처리 양성대조군이나 관계없이 239 bp 크기의 밴드가 일정하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. Fig. 2는 A549세포에 디젤분진을 5, 10, 50 ppm으로 6시간 처리한 경우의 MT-1 유전자 발현을 나타낸 것이다. 그림에서 나타난 바와 같이 디젤분진의 처리농도가 높아질수록 MT-1의 유전자 발현은 증가하는 것을 볼 수 있었다. 본 실험에서 처리된 카드뮴 0.1 ppm 농도는 디젤분진 50 ppm에 해당하는 밴드와 그 크기가 유사한 것으로 보인다. MT-2의 경우에도 디젤분진에 의한 유전자 발현이 증가되는 것을 확인하였다 (Fig. 3). Real-time PCR에 의한 결과에 의하면 MT-1과 MT-2에 대한 Ct 값 (Threshold cycle)이

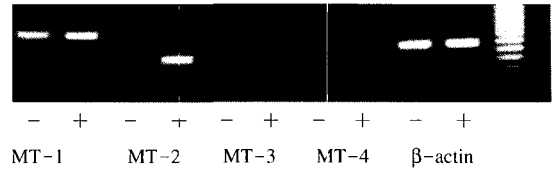


Fig. 1. mRNA expressions of metallothionein isomers MT-1, MT-2, MT-3, MT-4 by RT-PCR. Cadmium 0.1ppm was treated for 6hrs to induce the metallothionein gene. -represents for control and + represent for cadmium treated group. MT-1 (lane 1, 2) and MT-2 (lane 3, 4) were expressed but no band was shown in MT-3 (lane 5, 6) and MT-4 (lane 7, 8). β -actin mRNA is shown in lane 7, 8, without and with cadmium treatment, respectively.

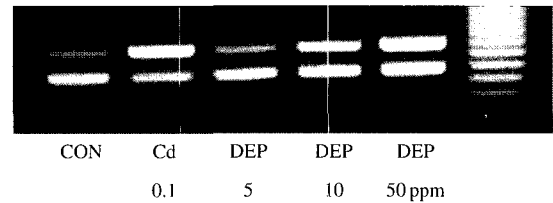


Fig. 2. Expression of MT-1 by diesel exhaust particles (DEP) measured by RT-PCR. lane 1: control, Lane 2: cadmium (0.1 ppm) treated group, lane 3: DEP 5 ppm, lane 4: DEP 10 ppm, lane 5: 50 ppm. lane 6: size marker. Human β -actin mRNA were also shown in lower bands.

Table 2. Ct values of MT-1 and MT-2 in cadmium and diesel treated group

	Control	Cadmium (0.1 ppm)	DEP (10 ppm)
MT-1	22.95	18.52	19.56
MT-2	24.69	20.19	21.57

* Real-time PCR amplification was done from 3 RNA samples of each group and mean value of Ct is represented.

대조군에 비해 디젤분진 (10 ppm) 및 카드뮴 (0.1 ppm)을 처리한 경우가 대조군에 비해 낮아진 것으로 나타나 메탈로치오닌 유전자 발현에 대한 RT-PCR결과를 보다 정량적으로 확인할 수 있었다 (Table 2). 본 연구에서의 real-time PCR 결과는 향후 보다 다양한 농도에 대해 체계적으로 수행함으로써 정량성을 확보하기 위한 예비 자료로 활용될

수 있을 것이다. 디젤분진은 그 시료의 종류나 형태 즉, 발생원에 따라 그 함유성분 및 독성발현이 매우 다양하다고 알려져 있다. 본 연구에서는 버스의 디젤분진과는 별도로 소형자동차의 디젤분진 시료를 포집하여 수용성 분획 및 유기성 분획으로 분리하고 각 분획에 대한 메탈로치오닌 유전자 발현을 조사하였다. 그러나 디젤분진 유기성 분획은 메탈로치오닌 유전자를 발현시키지 못하였을 뿐만 아니라 수용성 분획도 버스 디젤분진와는 다르게 메탈로치오닌 유전자를 거의 발현시키지 않는 것으로 추정되었으며 (데이터 미제시) 따라서 디젤분진은 그 배출원에 따라 매우 다른 성질을 가질 수 있다는 것을 확인할 수 있었다. 향후, 버스, 트럭, 승용차 등 차종에 대한 디젤분진과 같은 차종이라 하더라도 내구연한이나 엔진의 가속 정도 등에 따른 각종 디젤분진을 포집하고 이들의 유해특성에 관한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

디젤분진의 중금속 측정결과는 Table 3에 나타나 있다. 결과에서 보는 바와 같이 비소(As) 및 수은(Hg)이 ppb 수준에서 검출되었으며 메탈로치오닌 유도에 대해 가장 민감한 작용을 나타내는 것으로 알려진 아연(Zn)이 151 ppm으로 가장 높게 나타났다. 크롬(Cr), 카드뮴(Cd), 납(Pb)은 검출한계이하의 농도로 나타났다. 본 연구에서 사용한 디젤분진 시료의 메탈로치오닌 유전자 발현과 관련하여서는 아연이 가장 높은 기여도를 가질 것으로 판단되었다. 그러나 Fig. 2 및 Fig. 3에서 나타나듯이 카드뮴은 0.1 ppm의 농도에서도 MT를 발현시키는 것으로 보아 아연이외의 미량으로 존재하는 중금속 등도 본 연구에서 사용한 디젤분진의 MT 발현에 어느 정도는 기여하였을 것으로 판단된다.

본 연구는 중금속노출에 대한 분자생물학적 지표인 메탈로치오닌 유전자발현에 미치는 디젤분진의 영향을 조사한 것으로서 분자생물학적 지표를 이용한 위해성평가 방법론 확립의 기초자료로 활용하고자 하였다(박광식 등, 2003). 디젤분진과 메탈로치오닌 유전자 발현과의 관계를 조사한 연구는 아직까지 찾아보기 어려울 만큼 그 사례가 극히 드물었다. 향후 in vitro에서 노출된 디젤분진의 양과 대기중 디젤분진의 양을 환산하는 방법의 도입, 개별 중금속에 대한 A549세포에서의 메탈로치오닌 유전자 발현능력의 비교, 혼합 중금속의 영향(상승 또는 상가작용) 및 디젤분진의 중금속 함량

Table 3. Analysis of heavy metals in diesel exhaust particles

Heavy metals	Zn	Pb	Cd	Cr	As	Hg
Concentration	151.3 ppm	<3 ppm	<0.6 ppm	<1.8 ppm	22.6 ppb	137.9 ppb

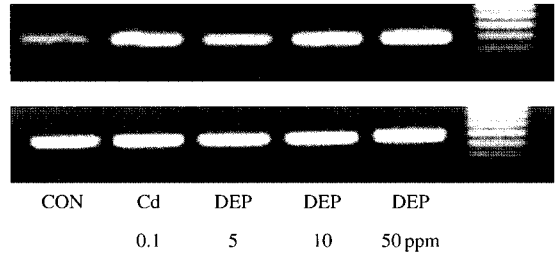


Fig. 3. Expression of MT-2 by diesel exhaust particle (DEP) measured by RT-PCR. lane 1: control, Lane 2: cadmium (0.1 ppm) treated group, lane 3: DEP 5 ppm, lane 4: DEP 10 ppm, lane 5: 50 ppm. lane 6: size marker. Human β -actin mRNA is also shown in lower panel.

과의 관계 등 보다 다양한 연구를 통해 대기 유해물질인 디젤분진이 인체에 미치는 위해성을 예측하고 판단하는 데 기여할 수 있으리라 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2002년 환경부의 “차세대 핵심환경기술개발사업 (Eco-technopia 21 project)”으로 지원받은 과제입니다.

참고 문헌

박광식, 구자민. 인간폐포세포 유래 A549세포주에서의 Cadmium 처리에 의한 메탈로치오닌 유전자 발현, 환경독성학회지 2003; 18(1): 15-19.
 Amakawa K, Terashima T, Matsuzaki T, Matsumaru A, Sagai M and Yamaguchi K. Suppressive effects of diesel exhaust particles on cytokine release from human and murine alveolar macrophages. *Exp. Lung Res.* 2003; 29(3): 149-64.
 Bunker J, Muller MM, Krahl J, Baum K, Weigel A, Hallier E and Schulz TG. Mutagenicity of diesel exhaust parti-

- cles from two fossil and two plant oil fuels. *Mutagenesis* 2000; 15(5): 391–397.
- Carero A, Hoet PH, Cerschaee L, Schoeters G and Nemery B. Genotoxic effects of carbon black particles, diesel exhaust particles, and urban air particulates and their extracts on a human alveolar epithelial cell line (A549) and a human monocytic cell line (THP-1). *Environ Mol. Mutagen*, 2001; 37(2): 155–63.
- Coyle P, Philcox JC, Carey LC and Rofe AM. Metallothionein: The multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Science* 2002; 59: 627–647.
- Hiura TS, Li N, Kaplan R, Horwitz M, Seagrave JC and Nel AE. The role of a mitochondrial pathway in the induction of apoptosis by chemicals extracted from diesel exhaust particles. *J. Immunol.* 2000; 165(5): 2703–2711.
- Hiura TS, Kaszubowski MP, Li N and Nel AE. Chemicals in diesel exhaust particles generate reactive oxygen radicals and induce apoptosis in macrophages. *J. Immunol.* 1999; 163(10): 5582–5591.
- Ishihara Y and Kagawa J. Dose–response assessment and effect of particles in guinea pigs exposed chronically to diesel exhaust; analysis of various biological markers in pulmonary alveolar lavage fluid and circulating blood. *Inhal. Toxicol.* 2002; 14(10): 1049–1067.
- Jiang SS, Chen TC, Yang JY, Hsiung CA, Su JJ, Liu YL, Chen PC and Juang JL. Sensitive and quantitative detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection by real–time nested polymerase chain reaction. *Clin. Infect. Dis.* 2004; 38(2): 293–296.
- Kagawa J. Health effects of diesel exhaust emissions; a mixture of air pollutants of worldwide concern. *Toxicology* 2003; 181–182, 349–353.
- Kodavanti UP, Moyer CF, Ledbetter AD, Schladweiler MC, Costa DL, Hauser R, Christiani DC and Nyska A. Inhaled environmental combustion particles cause myocardial injury in the Wistar Kyoto rat. *Toxicol. Sci.* 2003; 71(2): 237–245.
- Lambert E, Kille P and Swaminathan R. Cloning and sequencing a novel metallothionein I isoform expressed in human reticulocytes. *FEBS Letters* 1996; 389: 210–212.
- Lee C, Jeon SH, Na JG and Park K. Sequence analysis of choriogenin H gene of medaka (*Oryzias latipes*) and mRNA expression. *Environ. Toxicol. Chem.* 2002; 21(8): 1709–1714.
- Madden MC, Dailey LA, Stoneherner JG and Harris BD. Responses of cultured human airway epithelial cells treated with diesel exhaust extracts will vary with the engine load. *J. Toxicol. Environ. Health A* 2003; 66(24): 2282–2297.
- Marano F, Boland S, Bonvallot V, Baulig A and Baeza–Squiban A. Human airway epithelial cells in culture for studying the molecular mechanisms of the inflammatory response triggered by diesel exhaust particles. *Cell Biol. Toxicol.* 2002; 18(5): 315–320.
- Nemmar A, Hoet PH, Dinsdale D, Vermeylen J, Hoylaerts MF and Nemery B. Diesel exhaust particles in lung acutely enhance experimental peripheral thrombosis. *Circulation.* 2003; 107(8): 1202–1208.
- Palmiter RD, Findley SD, Whitmore TE and Durnam DM. MT–III, a brain–specific member of the metallothionein gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 6333–6337.
- Pfaffl MW, Gerstmayer B, Bosio A and Windisch W. Effect of zinc deficiency on the mRNA expression pattern in liver and jejunum of adult rats: monitoring gene expression using cDNA microarrays combined with real–time RT–PCR. *J. Nutr. Biochem.* 2003; 14(12): 691–702.
- Pohjola SK, Lappi M, Honkanen M and Savela K. Comparison of mutagenicity and calf thymus DNA adducts formed by the particulate and semivolatile fractions of vehicle exhausts. *Environ. Mol. Mutagen.* 2003; 42(1): 26–36.
- Salvi S, Blomberg A, Rudell B, Kelly F, Sandstrom T, Holgate ST and Frew A. Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short–term exposure to diesel exhaust in healthy human volunteers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999; 153(3): 702–709.
- Scheepers PT and Bos RP. Combustion of diesel fuel from a toxicological perspective II. Toxicity. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 1992; 64(3): 163–177.
- Schmidt CJ, Jubier MF and Harmer DH. Structure and expression of two human metallothionein–I isoform genes and a related pseudogene. *J. Biol. Chem.* 1985; 260(12): 7731–7737.
- Wang HW, Chen FW, and Ueng TH. Induction of cytochromes P–450 1A1 and 1B1 by motorcycle exhaust particulate in human breast cancer MCF–7 cells. *J. Toxicol. Environ. Health A* 2002; 65(19): 1401–1417.
- Watanabe N and Oonuki Y. Inhalation of diesel engine exhaust affects spermatogenesis in growing male rats. *Environ. Health Perspect.* 1999; 107(7): 539–544.