[UCI]I804:24011-200000233250

2006년 8 월
박사학위논문

카드뮴 중독 흰쥐에서 간세포 세포자멸사에 관한 연구

조선대학교 대학원

의 학 과

이 용

카드뮴 중독 흰쥐에서 간세포 세포자멸사에 관한 연구

Cadmium-induced hepatotoxicity in rat: the mechanism of apoptosis

*2006*년 *8*월 일

조선대학교 대학원

의 학 과

이 용

카드뮴 중독 흰쥐에서 간세포 세포자멸사에 관한 연구

지도교수 임 성철

이 논문을 의학박사학위 신청논문으로 제출함

*2006*년 *4*월 일

조선대학교 대학원

의 학 과

이 용

이용의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 서재홍 인

위 원 조선대학교 교수 전호종 인

위 원 조선대학교 교수 문경래 인

위 원 조선대학교 교수 이미자 인

위 원 조선대학교 교수 임성철 인

*2006*년 *6*월 *30*일

조선대학교 대학원

목 차

1. 도목차---------- i

2. 영문초록 ----------iii

Ⅰ. 서론 ----------1

Ⅱ. 연구대상 및 방법----------4

Ⅲ. 결과----------8

Ⅳ. 고찰 ----------10

Ⅴ. 결론 ----------18

Ⅵ. 참고문헌 ----------19

도목차

Figure 1. Change of body weight in cadmium treated group. The body weight of cadmium treated groups was decreased in time dependent. *P<0.05.

Figure 2. Change of AST and ALT in cadmium treated group. Serum AST/ALT level was increased in the cadmium treated group with time-lapse. *P<0.05, ** p<0.001.

Figure 3. Expression of caspase 8 in cadmium treated group. No significant changes of caspase 8 was identified.

Figure 4. Expression of Bid in cadmium treated group. Cadmium induced Bid cleavage in all groups.

Figure 5. Expression of Bax in cadmium treated group. The cytosolic Bax was incresed, but the mitochondrial Bax was decreased with time. This finding suggested Bax translocation from cytosol into mitochondria.

Figure 6. Expression of cytochrom-c in cadmium treated group. The mitochondrial cytochrome-c was decreased, but the cytosolic cytochrome-c was increased. This finding suggested cadmium induced cytochrome-c release from mitochondria to cytosol.

Figure 7. Expression of caspase 3 in cadmium treated group. Procaspase-3 was decreased, but cleaved caspase-3 was increased. This finding suggested cadmium induced caspase-3 cleavage with time-lapse.

Figure 8. Expression of PARP in cadmium treated group. PARP was decreased, but cleaved-PARP was increased. This finding suggested cadmium induced PARP cleavage with time-lapse.

Figure 9. Expression of caspase 9 in cadmium treated group. Caspase-9 was decreased with cadmium treatment with time-lapse.

Figure 10. Expression of Bcl-2 in cadmium treated group. Bcl-2 was decreased with cadmium treatment with time-lapse.

Figure 11. Histopathologic findings of liver in cadmium treated groups. Cytoplasmic eosinophilia (arrows) with nuclear pyknosis of the hepatocytes was increased with time. Lobular disarray with ballooning degeneration was evident in the 7 day group.

Figure 12. Histopathologic findings of liver in cadmium treated groups. Apoptotic bodies (arrows) are noted frequently. Apoptoticbodies (arrows) are noted frequently.

Figure 13. Immunohistochemical staining of liver for Bax in cadmium treated groups. Cytoplasmic expression of Bax was increased with time-lapse.

Figure 14. Classic apoptosis pathway.

Figure 15. Cadmium-induced apoptosis pathway proposal in the rat liver.

Abstract

Cadmium-induced hepatotoxicity in rat: the mechanism of apoptosis

Yong Li, MD
Advisor: Prof. Sung-Chul Lim, M.D., Ph.D.
Department of Medicine
Graduate School of Chosun University

Background and Objectives: Cadmium (Cd) is a heavy metal of considerable environmental and occupational concern. Liver is a major target organ of Cd toxicity following repeated Cd exposures. The aim of this study was to investigate the mechanism of apoptosis on Cd-induced hepatotoxicity in animal model.

Materials and Methods: Twenty-four adult male Sprague-Dawley (SD) rats were injected with a dose of Cd acetate daily (30 μmol/kg body weight, intraperitoneally). After 1, 2 and 7 days the rats were killed, and the blood and liver tissues were sampled for analysis. Biochemical analyses of serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were conducted. Histopathologic, immunohistochemical and Western blot analyses for cellular damage and apoptosis of the liver were conducted.

Results: Decrement of the body weight was identified slowly after 1 day. Serum AST/ALT level was increased. According to the Western blot analyses, caspase-3, -9, Bax, Bid and PARP were decreased and caspase-3, Bid and PARP were cleaved with time- and dose-dependently. Decrement of cytosolic Bax with accordingly increment of the mitochondrial Bax was identified. The mitochondrial Bax induced release of cytochrome C from mitochondria to cytosol. Bcl-2 was decreased but, caspase-8 was not shown significant changes. Histopathologic analysis showed cytoplasmic eosinophilia with nuclear pyknosis of the hepatocytes with time lapse. Lobular disarray with ballooning degeneration was evident. Cytoplasmic expression of Bax was increased with time.

Conclusions: Cd could induce loss of body weight and liver cell damage in SD rat. Cd-induced liver cell damage is associated with apoptotic pathway from activation of Bid and Bax to activation of caspase -3 and -9 through release of mitochondrial cytochrome c, and this is not associated with activation of caspase 8. These results suggest that Cd-induced liver cell apoptosis in rat may not related to the death-receptor pathway. Moreover, this apoptosis is time- and dose-dependent and associated with decrement of Bcl-2.

Therefore, the mechanism of Cd-induced apoptosis in the hepatocytes of the SD rat in 7 days involved mitochondrial-dependent pathway but not death-receptor related caspase-dependent signaling.

KEY WORDS : Cadmium, Apoptosis, Rat, Hepatocyte, Mitochondria

I. 서 론

카드뮴은 인류의 역사와 함께 산업발전의 큰 부분을 차지해 온 인체대사에 불필요한 유해 금속물질 중의 하나이다. 환경 중에 널리 분포되어 있는 카드뮴은 생체에 해로운 고독성 중금속으로서 산업이 발달함에 따라 생체에 대한 노출빈도는 점점 증가하고 있다(Friberg 등, 1979).

카드뮴은 일반적으로 신기능 장애, 간 조직 손상, 골연화증을 유발하며, 저 농도의 카드뮴을 장기간 노출시킨 실험동물에서 고환조직 손상, 생식 독작용 및 발암작용이 있는 것으로 알려져 있다. Nordberg(1972)는 원숭이에 체중 kg당 1.7 mg의 카드뮴을 일회 경구 투여하였을 때 카드뮴의 체내 반감기는 약 1.7 년이며 마우스에 체중 kg당 0.25 mg의 용량을 피하로 25 주간 매일 투여할 경우 카드뮴의 체내 반감기는 24 년이고, 특히 신장 내에 축적된 카드뮴의 반감기는 10 년 이상임을 보고하였다. 인체내로 흡수된 카드뮴은 폐장, 신장, 간장 등 거의 모든 장기에 손상을 일으키며 골격과 면역계, 생식기계 및 순환기계 장애와 기형 및 암을 유발하는 것으로 알려져 있다(Dudley 등, 1985). 카드뮴에 급성 및 만성으로 노출 되었을 때 표적장기인 신장, 간장 및 고환 등에서 카드뮴은 과산화 연쇄반응(peroxidative chain reaction)을 자극하여 지질과산화(lipid peroxidation)를 촉진하고 이로 인해 활성산소종이(reactive oxygen species) 발생되어 세포독성을 유발하는 것으로 보고 있다(Fukuno 등, 1984; Halliwell & Gutteridge, 1995; Oteiza 등, 1999).

카드뮴을 비롯한 중금속의 인체에 미치는 영향 및 독성기전을 밝히기 위한 연

구들은 여러 분야에서 활발히 진행되고 있는데, 최근에는 중금속의 급 만성 세포독성기전과 발암작용에 있어 endonuclease를 활성화시키거나 활성산소종과 같은 반응성 자유 라디칼(reactive free radical)을 생산하거나(Nath 등, 1996; Hultberg & Andersson, 1998)세포전달체계를 경유하는 세포자멸사(apoptosis)가 중요한 역할을 한다는 연구결과들(Lohmann & Beyersmann, 1993; Azzouri 등, 1994; Shenker등, 1997; Habeebu 등, 1998; Hirata 등, 1998)이 있다. 그러나 이러한 연구에도 불구하고 카드뮴의 정확한 독성기전은 아직 잘 밝혀지지 않고 있다.

세포내부의 복잡한 과정을 거쳐 세포자멸사가 일어나게 되는데 (Wyllie, 1980; Cohen, 1993; Klaus & Davide, 1998), 이것은 종양괴사인자(tumor necrosis fator)에 의한 세포사멸연구와 함께 일부신호 전달기전이 밝혀지면서 연구되기 시작되었다(Alnemr 등, 1996). 그 간의 연구에서 세포자멸사의 과정에 caspase계 cysteine proteases나 MAP kinase (mitogen activated protein kinase)의 관련성이 제시되고 있으며 (Blenis, 1993; Xia 등, 1995; Alnemri 등, 1996; Enari 등, 1996; Kluas & Davide, 1998), 일부 전사인자(transcriptional factor)와도 관련이 있음이 알려져 있다. 따라서 이러한 유전자들의 활성화 여부 및 양상을 관찰한다면 세포자멸사 유도기전을 파악하는데 중요한 자료를 얻을 수 있을 것이다.

현재 카드뮴의 세포자멸사 유도에 대한 연구는 드물며 이에 대한 정보 역시 제한적이다. 실험은 주로 *in vivo*와 *in vitro*로 이루어지는데 조직 또는 세포가 중금속에 노출시 폭로 시간과 농도에 따라 세포자멸사 또는 괴사를 일으키는 것으로 알려져 있으나 상대적으로 *in vivo* 실험이 적다. 카드뮴은 인체에 만성적인 폭로시 간과 신장에 축적되는 반면(Shaikh & Lucis, 1972; Kotsonic &

Klassen, 1977) 급성 폭로시에는 주로 간에 축적된다(Kotsonic & Klassen, 1977). 카드뮴에 의한 급성 폭로시 간독성은 간세포의 부종, 지방변화, 국소 또는 광범위한 괴사 등으로 나타나며(Dudley 등, 1982), 전자현미경상으로는 세포내 리보솜의 확장과 막에 부탁된 리보솜의 손실, 핵 응축 등이 나타난다(Dudley 등, 1984). 또한 카드뮴은 분리된 소 또는 쥐의 간세포, 백혈구세포 등에서 시간과 농도가 증가함에 따라 세포사멸을 일으키는 것으로 보고되고 있다(Lohmann & Beyersmann, 1994; EL-Azzouzi 등, 1994). 그러나 이러한 많은 연구에도 불구하고 카드뮴의 독성기전이나 세포내 분자 수준의 신호전달경로에 대해서는 정확히 알려진 바가 없다.

이에 본 연구는 카드뮴의 주요한 표적장기이며 카드뮴이 만성 및 급성 폭로시 축적되는 가장 중요한 장기인 간에 미치는 세포독성 기전을 밝히고자 하였다. 카드뮴 처리 후 적출된 SDSD흰쥐의 간을 이용하여 병리조직학적변화를 비교 관찰하고, 세포자멸사에 관여하는 caspase-3, -8, -9, Bax, Bcl-2, cytochrome-c, Bid, poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 등 단백질의 발현 여부 및 변화를 면역조직화학적 분석 및 Western blot analysis를 통하여 비교 관찰하여 카드뮴의 간세포독성과 관련된 세포자멸사 관련신호전달체계의 경로를 규명하고자 한다.

I. 연구재료 및 방법

1. 시약

Cadmium acetate dihydrate (5743-04-4)는 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MI, USA)의 제품을 사용하였으며, 일차항체 caspase -3 (H-277), -8 (H-134), -9 (H-170), PARP (H-250), cytochrome-c (6H2), Bid (FL-195), Bcl-2 (C-2), Bax (B-9)는 Santa Cruz Biotechnology사(Santa Cruz, CA, USA), p53 (DO-7)은 Dako 사(Glostrup, Denmark)의 제품을 사용하였다. 그리고 이차항체 Vectastain ABC elite kit와 발색제 amino ethyl carbazole (AEC) kit는 Vector laboratories (Burlingame, CA, USA), 범용 봉입제(universal mount)인 Clear mount는 Zymed사 (South San Francisco, CA, USA)의 제품을 사용하였다.

2. 실험동물

실험동물은 출생 후 4주되는 카드뮴에 노출된 적이 없는 Sprague-Dawley (SD) 수컷 흰쥐(220 ± 30g) 24마리를 사용하였으며, 사료와 물은 자유롭게 공급되었다. 사육조건은 22℃～26℃, 습도는 50%, 광 조건은 명기 12시간 암기 12시간이었다.

3. 실험방법

SD흰쥐를 대조군과 카드뮴 투여 1일, 2일, 7일 실험 군으로 나누어 각 그룹 당 6마리씩 구분하여 카드뮴을 대퇴내측에 피하로 투여하였다. 카드뮴은 증류수에 녹인 후 여과 멸균하여 30μM/kg 농도로 매일 1회 투여하였는데 투여양은 Jeong 등 (2000)과

Tzirogiannis 등 (2003)의 연구내용을 참고하였다. 대조군은 카드뮴 대신 생리식염수를 실험군과 동일한 방법으로 투여하였다. 실험동물은 카드뮴을 투여한 후, 1 일째, 2 일째, 7 일째 각각 6 마리씩 단두 희생시켰다. 혈액은 단두하여 경부에서 채취하고 간의 일부는 조직병리학 검사를 위하여 10% 중성 포르말린용액에 24 시간 동안 고정하였다. 신선하게 채취된 간 조직 일부는 Western blot 검사를 위하여 PBS (phosphate-buffered saline)용액에 즉시 담구어 혈액을 세척한 후 분석하였다.

4. Western Blot 분석

채취한 SDSD흰쥐 간 조직을 PBS로 충분히 세척하였다. 1 g 간조직에 3 ml의 파쇠용액 homogenizer buffer (10 mM Tris-Hcl PH 7.5; 150mM Nacl; 1 % Nonidef p-40; 0.1 % sodium dodecyl sulfate; 1% sodium deaxycholate; 1mM PMSF; 5 mM EDTA)에 넣어 4 ℃에서 파쇄시켰다. 13,000 rpm에서 20 분 원심 분리하여 얻은 세포 파쇄 액은 BCA 용액을 이용하여 단백질을 정량하였다. 동량의 세포파쇄액(단백질: 200 ug)은 2×sample buffer와 섞어 100 ℃에서 5 분간 끓인 후에 12.5 % SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 semi-dry 방법으로 실온에서 단위면적당 0.8 mA 전하를 2 시간 걸어주어 nitrocellulose membrane상에 이동시켰다. nitrocellulose membrane은 blocking buffer(5 % skim milk)와 상온에서 1 시간 반응시켜 비 특이적 항체결합을 억제시켰다. caspase-3, -8, -9, Bax, Bid, Bcl-2 및 cytochrome c에 대한 항체는 0.01 %(v/v)의 Tween-20이 포함된 3 % skim milk/TBST에 1:1000으로 희석하여 상온에서 3 시간을 반응 후 TBST로 15 분씩 3 번 세척하여 이차항체 anti-rabbit IgG conjugated hose-radish peroxidase와 1 시간 반응시켰다. nitrocellulose membrane은 TBST(10 mM Tri-Hcl, 150 mM Nacl, 0.01

% Tween-20, pH 7.4)로 세 번 세척 후 ECL kit를 사용하여 ECL 필름에 노출시켰다.

미토콘드라아의 단백질 변화를 보기위하여 파쇄된 간 조직을 4 ℃, 700×g에서 원심분리 10 분후 얻은 상층액을 10,000×g에서 또 다시 10 분간 원심분리하여 pellet는 다시 파쇄액을 첨가하여 6000×g에서 3 분간 다시 원심분리한다. 여기서 얻은 pellet를 medium containing 225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 10 mM Tri-HCl, pH 7.4, 0.1 mM EDTA 으로 용해시켰다(Silva Freitas EM 등, 2006). Bcl-2, caspase 3, Bax translocation 및 cytochrome c 의 유리에 대한 분석은 Western blot 방법을 시행하였다.

5. 병리학적 검사

광학현미경 관찰을 위한 표본 제작과정은 적출해 낸 간장조직을 10 % buffered formalin에서 24 시간 고정시킨 뒤, 흐르는 물로 씻어 조직 내에 남아있는 formalin을 제거하고 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 100 % ethyl alcohol에서 각각 1 시간씩 탈수과정(dehydration)을 거쳤다. Xylene 치환과 paraffin 침투과정을 거친 후 포매하여 블록을 제작하였다. 이렇게 준비된 paraffin 블록을 회전형 박절기(microtome)를 사용하여 4 ㎛두께로 유리 슬라이드 시편을 제작하였다. Xylene으로 3~5분씩 2 회 처리한 후 ethanol을 100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %순으로 1 분씩 탈 파라핀 과정을 거친 후 수돗물에 10 분간 세척하였다. hematoxylin에서 5 분간 반응 후 수돗물에서 1 분간 세척한 후 1 % acid alcohol에 4 회 침척 후 수돗물에 1 분간 세척한다. 이후 ammonia에 4회 침척 하고 수돗물에 15 분간 세척하였다. 그리고 eosin에 3 분간 염색을 한 후 ethanol을 80 %, 90 %, 100 %순으로 처리한 후 xylene을 3 분씩 2

회 처리한 후 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

면역조직화학적 염색은 전술된 술식에 따라 조직 절편을 탈 파라핀과 함수한 후 0.01 M 구연산 완충액(pH 6.0)에 담가 전자렌지에서 15 분간 한번 가열하여 항원의 발현을 증가시켰다. 이후 내부 과산화효소를 억제하기 위해서 3 % H_2O_2를 처리한 다음 5 % 정상 염소 혈청(0.1 % 우혈청 알부민으로 희석)으로 비 특이적인 항원-항체 반응을 억제하였다. Bax, Bcl-2, Caspase-3, -8, -9 및 p53 일차항체를 각각 37℃ 배양기에서 2시간 반응시킨 후 이차항체 Vectastain ABC elite kit를 이용하여 제품설명서에 따라 처리하였다. 발색제는 AEC kit를 사용하여 현미경으로 반응을 관찰하며 5-10분 정도 반응시킨 후 Mayer's hematoxylin으로 대조염색을 한 후 Clear mount로 봉입하였다.

6. 혈액 채취

혈액은 SD흰쥐를 단두희생 할 때 경부에서 흐르는 피를 채취하여 혈청을 분리해낸 후 International Federation of Clinical Chemistry (IFCC)에 의한 rate assay 법으로 AST와 ALT분석하였다.

7. 통계학적 분석

Chi-Square test 와 Analysis of Variance를 이용하였고, 통계검사는 $P<0.05$ 이하일 때 통계학적으로 유의성이 있는 것으로 평가하였다.

III. 결과

1. 체중변화

카드뮴 투여 후 체중변화를 관찰한 결과 1일째 되는 군은 체중증가가 101 %인 반면 대조군은 98 %로 약간 감소되었으며, 2일째 되는 군은 체중증가가 105 %인 반면 대조군은 98 %로 1 일째와 2 일째는 현저한 차이는 없었다. 그러나 7 일째에는 카드뮴투여군의 체중증가가 93 %로 대조군의 123 %에 비하여 의미 있게 감소하였다($p<0.05$) (Fig. 1).

2. 혈액 *ALT, AST* 변화

카드뮴 투여군에서 ALT는 1 일째에 228 %로 의미있게 증가하였으며 ($P<0.05$), AST는 1일째에 112 %로 다소 증가하였다. 2 일째에는 ALT와 AST가 각각 214 %, 162 %로 유의하게 증가였다($P<0.05$). 7 일째에는 ALT와 AST가 각 386 %와 410 %로 대조군에 비하여 현저한 증가를 보였다($P<0.001$) (Fig. 2).

*3. Western Blot*에서의 각 단백질의 변화

Caspase 8는 시간 경과에 따라 유의한 변화가 없었다(Fig. 3). Bid는 카드뮴 투여 1 일군에서부터 cleaved form이 보였으며(Fig. 4), mitochondia Bax는 증가하는 양상(Fig. 5)을 보였으며 cytosol에서는 감소양상을 보였다.

Cytochrome-c 는 mitochondria에서는 감소되는 반면 cytosol에서는 증가하였다(Fig. 6). Caspase 3, PARP 은 감소하는 반면 cleaved form은 증가하였다(Fig. 7, 8). Caspase 9, Bcl-2는 감소하는 양상을 보였다(Fig. 9, 10).

4. 조직학적의 관찰

광학현미경적 관찰결과 정상 군에서는 중심정맥을 중심으로 하여 간세포가 일정한 코드배열을 이루고 있는 반면 카드뮴 처리군에서는 시간경과에 따라. 세포가 부풀어 오르고 호산성변화가 증가하며 세포핵이 진하게 염색되고 핵의 응축 및 분절이 증가하는 등세포손상이 심해지는 것을 볼 수 있었으며 여러 가지 양상의 apoptotic body가 관찰되었다. 카드뮴을 투여한 1 일군에서는 간세포의 핵과 세포질에서 변성이 관찰되었으며, 7 일군에서는 이러한 변화가 매우 심해서 간세포 파괴가 많이 관찰되었다(Fig.11, 12).

5. 면역조직화학적관찰

면역조직학적 검사에서 Bax는 세포질염색이 되었으며 대조군에서 염색되지 않는데 비해 카드뮴 처리군은 세포의 손상에 따라 점점 증가하는 추세를 보여 7 일군이 염색이 가장 강하였다(Fig. 13).
그러나 Bcl-2, p53, caspase-3, -8, -9은 대조군 및 처리군 모두 매우 미약한 반응을 보일뿐만 아니라 그 강도 및 양상의 유의한 변화를 파악할 수 없었다.

Ⅳ. 고 찰

수은, 카드뮴 등 중금속에 의한 피해는 산업문명의 발달로 점차 증가하고 있는 추세이며, 중독 발행 유형은 크게 다음과 같이 나눌 수 있다. 즉 이들 중금속에 지속적으로 노출된 결과 발행하는 근로자들의 직업성 중독과 산업폐수로 방출된 중금속이 생물학적 먹이 사슬이나 식품을 통해 간접적으로 인체에 흡수되어 중독증을 유발하는 간접적인 중독으로 구분된다(Goyer, 1991; Mailman, 1980).

특히 카드뮴 사용의 역사는 1871년 아연광석에서 처음으로 인지된 이래 급속한 산업발전과 더불어 전기도금, 도료, 플라스틱, 합금, 축전지 등에서 널리 사용되고 있으며 수계(지하수, 지표수), 육류, 곡물, 유제품, 야채 등에서도 나타나고 있다(Christensen & Olson, 1957; Fleisher 등, 1974; Flick 등, 1971).

일반적으로 카드뮴은 신기능 장애, 간조직 손상, 중추신경 장애, 고혈압, 골연화증 등을 일으키며, 특히 폐기능 장애, 폐암환자들에 있어서는 카드뮴축적이 높게 나타난 것으로 알려져 있다(Axelesson 등, 1968; Dudley 등, 1984; Goyer, 1991). 카드뮴에 급성 및 만성으로 노출 되었을 때 표적장기인 신장, 간장 및 고환 등의 조직에서의 카드뮴의 과산화 연쇄반응을 자극하여 지질과산화를 촉진하고 이로 인해 활성산소종이 활성화 되어 세포독성으로 유발하는 것으로 보고 있다(Fukuno 등, 1984; Halliwell & Gutteridge, 1995; Oteiza. 1999). 본 실험에서는 카드뮴을 투여 후 체중변화를 관찰한 결과 대조군에서는 1 일째부터 체중증가가 꾸준히 이루어졌으며 7일째에는 123%로 의미있게 증가하였으며 카드뮴 투여군에서는 1 일째부터 체중감소가 일어나면서 2 일째에는 의미있게 감소하였으며 7 일째에는 현저한 차이를 보였다. 이것을 보아 카드뮴 독성으로

인한 급성독성은 30 μmol/kg농도에서 지속적으로 작용하는 것으로 생각된다. 이러한 결과는 생쥐에 메틸수은을 투여한 Thuvander 등(1996)의 보고와 비슷한 결과를 보였다. 이는 중금속으로 투여로 인하여 간장에 손상이 오고 이로 인하여 체중감소가 초래된 것으로 사료된다.

AST와 ALT는 모두 간세포속에 함유되어 있는 효소로서, 간세포가 깨지거나 간 세포막의 투과성이 높아지면 이들 효소는 혈액속에 유출되어 증가한다. AST란 생체의 여러 가지 장기세포 가운데 있는 효소로 몸의 중요한 구성요소인 마미노산을 형성하는 작용을 한다. 건강한 사람의 혈액중에도 세포에 함유되어 있는 AST가 소량 유출되고 있으나 장기의 세포가 파괴되면 대량 흘러나오게 된다. 심장, 간, 골격근, 신장에 특히 많은 효소이다. ALT도 AST와 마찬가지고 아미노산을 형성하는 하나의 요소이며, ALT양은 AST에 비해 적고 가장 많이 포함된 간에서도 AST의 약 1/3 정도이다. AST에 비해 ALT는 간 특이성이라고 할 정도로 간에 많이 포함되어 있다. 특히 급성 간염, 만성 간염, 알코올성 간염 등에서는 병세에 따라서 그 수치가 증감하므로 이들 병을 진단을 하거나 그 경과를 관찰하는데 사용된다. 본 연구에서도 ALT는 1일째부터 높은 증가폭을 보였으며 1 일째, 2 일째에는 AST보다 증가폭이 높았다 AST와 ALT는 모두 처음부터 끝까지 꾸준한 증가 추세를 보였으며 7 일째 최고치로 증가되는 것을 볼 수 있는데 이는 급성 간세포 손상 때문으로 생각된다. 이러한 결과는 간장의 손상으로 인해 체내 효소의 합성이 증가되는 등의 부작용이 나타나고, 특히 포도당 대사에 관여하는 효소의 부족 등으로 인하여 각 장기의 중량이 줄었다는 보고(Dieter 등, 1983; Ochi 등, 1988)와도 관련되어 체내 대사가 저하되고 결과적으로 정상적인 체중증가가 나타나지 않고 오히려 체중감소가 초래된다고 생각된다.

생명체를 이루는 기본 단위인 세포는 유한한 생명을 가지고 있다. 세포가 생명체내에서 성장 및 분화과정을 거쳐 그 기능을 발휘한 후에는 세포자멸사라는 예정된 죽음을 맞게 된다. 세포자멸사는 외부적 환경변화에 의하여 급격히 일어나는 수동적 죽음인 괴사(necrosis)와는 달리 세포내부에 존재하는 계획된 죽음의 프로그램이 신호에 의해 개시된 세포내에서 여러 유전자들이 발현됨으로서 일어나는 능동적인 죽음이다. 세포자멸사는 괴사와는 다른 독특한 형태와 생화학 특징을 동반하는 유전자 활성에 의하여 조절받는 생리과정이다(Wyllie, 1980; Cohen, 1993). 세포괴사는 세포의 심각한 상해로 세포막의 파괴, 세포의 팽창, 용해를 동반하는 반면에 세포자멸사는 빠른 세포탈수현상에 의한 세포의 수축, 세포막의 수포화 현상(blebbing), 세포질내의 칼슘농도의 증가, 염색질의 응축, endonuclease의 활성화에 의한 DNA의 사다리 모양의 분절 현상, transglutaminase의 활성화 및 핵의 절단과 apoptotic body의 형성을 동반한다(Cohen, 1993; Klaus & Davide, 1998). 세포자멸사를 통한 세포사멸은 여러 유전자들 및 그 발현 단백질들에 의해 조절되며, 여러 신호전달계가 관여됨이 알려져 있다. 이 중 가장 잘 연구된 신호전달 경로 중의 하나는 death receptor에 의한 세포자멸사이다. Death receptor는 세포사멸의 기능을 갖는 tumor necrosis factor 2 (TNF 2) 수용체군을 의미하며, 수용체의 세포질 쪽 부위에 존재하는 death domain을 통하여 세포사멸 신호를 매개한다. 현재 다섯 종류의 death receptor가 알려졌으며 TNF receptor-1, Cd95 (Fas/APO-1), TNF-receptor-related apoptosis-mediated protein (TRAMP), TNF-related apoptosis-inducing ligand [1] receptor-1/2가 있다. 이들 수용체는 리간드와 결합하게 되면 수용체의 다중화(multimerization)를 통하여 활성화되고, 그 결과로 여러 adaptor 단백질들이 수용체와 결합하게 된다. 결합한 adaptor 단백질들은

여러 다양한 세포사멸 신호전달 체계를 활성화시킨다. death receptor들과 관련된 대표적인 신호조절인자들에는 caspase, NF-kB, stress-activated protein kinase (SAPK), Bcl-2 family 등이 있다. death receptor들이 모두 세포자멸사를 유도하는 것은 아니며 Apo2L(Fas-L과 매우 유사한 구조를 갖는 TNF군에 속하는 리간드)에 의한 세포자멸사을 저해하는 decoy receptor들인 DR4와 DR5의 존재도 알려져 있다.

세포자멸사는 다세포 생명체에서 정상적인 발달과정과 항상성을 유지해 주는 기본적인 생리현상이며 이질적이거나 위해한 세포를 신속하게 제거하는 과정이다. 따라서 이 과정의 장애는 악성종양, 자가면역 질환, 퇴행성 신경질환, 독소에 의해 유발되는 질환의 발생과 밀접한 관련이 있다(Fadeel 등, 1999).

세포자멸사에 대한 연구를 통하여 카드뮴의 세포독성기전을 밝히기 위한 연구가 시도되고 있으나 이에 대한 정보는 매우 제한적이다(Corcoran 등, 1994). 현재까지의 연구는 실험동물 또는 시험관내 실험에서 조직 또는 세포가 중금속에 노출 시 폭로량에 따라 괴사 또는 세포자멸사를 일으키는 것으로 알려져 있으나, 그 유도 기전 및 그 기전에 관여하는 물질에 대해서는 아직 확실히 밝혀지지 않고 있다(Beyesmann & Hechtenberg, 1997; Wang & Templeton 1998).

카드뮴을 비롯한 중금속에 의한 세포자멸사의 경우 일반적으로 몇 가지 공통된 기전이 제기되어 왔는데 예를 들면 구리결핍시 세포자멸사와 관련된 endonuclease를 유도한다든지(Rao 등, 1992), 소량의 셀레늄에 폭로시 Ca^{2+}, Mg^{2+} 의존 endonuclease를 활성화시켜 세포자멸사를 유도한다(Lu 등, 1994)는 등의 보고가 있다. 카드뮴은 칼슘 가동화를 통하여 endonuclease를 활성화 시키는데, 세포내 칼슘변화는 중금속 독성에 의해 유도되는 세포자멸사와 관련한 endonuclease 활성에 중요한 인자로 알려져 있다(Rao 등, 1993; Lu 등, 1994;

Azzouri, 1994). 다른 공통기전은 산화적 스트레스(oxidative stress)로서 생물학적으로 생체에 필수적으로 필요한 금속이 부족한 경우나 독성 중금속에 폭로된 경우 모두 활성화산소종과 같은 반응성 자유 라디칼을 생성하여 세포자멸사를 유도하는 것으로 알려졌다(Nath 등, 1996; Kayanoki 등, 1996; Hultberg, 1998).

세포자멸사를 유발시키는 세포내 신호전달기전에서 중요한 기전중 하나는 caspase의 활성화이다. Caspase는 효소 활성부위에 cysteine을 가지고 있는 단백질 분해효소로써 지금까지 14종류가 알려져 있으며, 특히 caspase 3의 역할에 대해서 많은 연구가 진행되고 있다(Allen 등, 1998; Widmann & Gibsonm, 1998). Caspase의 작용은 표적기질에 따라 아미노산 배열 중 DEVD (enzyme:cleaves the cpp32 protein recongnition site asp-glu-val)를 인식해서 절단하는 CPP-32 like caspase (capase 3)와 YVAD(펩타이드 저해제)를 인식해서 절단하는 ICE-like caspase로 대별된다. 일단 caspase 3가 활성화가 되면 PARP, MAPK/ERK kinase kinase (MEKK), 및 다른 Caspase 등 여러 표적 단백질에 작용해서 기능적 활성화나 불활성화를 유도하여 세포내의 여러 신호전달을 조절하는 것이다(Allen 등, 1998; Widmnn & Gibson, 1998). 일반적으로 우리가 알고 있은 세포자멸사의 경로는 Fig 14와 같이 caspase 8의 활성화로 인하여 Bid가 활성화가 되어 미토콘드리아를 통하여 caspase-9, -3가 작용하거나 caspase 8이 직접 caspase 3을 활성화시켜 일으키는 것이다. 모두 일반적으로 caspase-8과 -3를 경유하는 것으로 알려져 있다. 그러나 본 연구에서는 카드뮴 처리로 caspase-3, -9와 Bid의 활성은 전반적으로 시간의 경과에 따라 증가하고 있는데 caspase 8의 활성은 시간경과와는 무관하게 변화가 없었다. 따라서 세포내에서 세포사멸의 신호가 Bid를 활성화시켜 신호가 미토콘드리아에 전달되면 미토콘드리아에서 cytochrome c가 분비되어서 caspase 9을 활성화시

키고, 활성화된 caspase 9은 caspase 3을 활성화시켜 나타나는 세포사멸의 과정상의 특성으로 볼 때 caspase의 시간경과에 따른 변화는 카드뮴독성에 간 조직 세포사멸이 caspase 9와 3의 경로를 경유하여 발현됨을 증명하고 있었다.

또한, protein kinase (PKC), PARP 등은 세포사멸 과정에서 caspase 3의 세포내 표적인자이며 세포사멸 유도에 중요한 endonuclease의 활성화는 caspase 3 protease의 자극에 기인한다(Allen 등, 1998)는 보고에 의하면, 본 연구 결과에서 caspase 3가 활성을 보이고 기질 단백질인 PARP의 절단이 관찰되는 것은 카드뮴에 중독된 SD흰쥐간세포에서의 세포사멸은 caspase 3의 활성화를 통해 유도됨을 의미한다.

Bcl-2 family 단백질은 사람의 여포상 림프종과 밀접하게 관련된 유전자로서 크게 세포사멸 촉진 단백질(Bax)과 세포사멸 억제 단백질(Bcl-XL)의 두 종류가 존재하는 것으로 알려져 있다(Gross 등, 1999; Yel 등, 1999). 이중 Bcl-XL 단백질은 다른 암 유전자와는 달리 세포증식에는 관여하지 않고 세포사멸의 억제기능에 관여하고 있다. 한편 Bcl-2 family단백질은 c-terminus에 소수성 막으로 구성되어 미토콘드리아의 막에 결합할 수 있는 특징이 있다. 따라서 Bcl-XL을 과발현시켰을 경우 산화환원 반응의 조절, 세포내 이온의 분포조절, caspase protease의 활성, 미토콘드리아 막전위, 핵 DNA분절, 스트레스 관련 MAP kinase인 JNK 및 p38 kinase의 활성을 조절함으로써 세포사멸을 억제하는 것으로 알려져 있다. 반대로 Bax 단백질을 과발현시켰을 경우에는 cytochrome c의 분비가 촉진되고 미토콘드리아막의 탈 전위가 유도된다고 보고되고 있다(Herr 등, 1997; Yel 등, 1999).

본 연구에서 카드뮴 처리로 SD흰쥐 간세포의 세포질에서는 Bax의 양이 감소하고 미토콘드라아에서 증가하였는데 이러한 결과는 카드뮴에 의해 발현이 증

가된 Bax 단백질이 미토콘드리아로 이동하였으며 이동된 Bax 단백질이 미토콘드리아 막전위변화가 cytochrome c의 세포질내로의 방출을 유도하였다고 판단된다. 그리고 본 실험에서 억제인자인 Bcl-2는 감소를 보였다. 이는 억제인자 Bcl-2의 감소로 인해 세포자멸사가 더욱 이루어진다고 사료된다. 면역염색에서는 Bax의 발현이 관찰되었는데 세포질 염색이 되었으며 세포손상이 증가함에 따라 그리고, 시간이 증가함에 따라 발현이 증가되었다. 그 간의 연구보고들에 따르면, 세포질내로 분비된 cytochtome c가 세포질내에 존재하는 Apaf-1, dATP와 함께 caspase 9 protease의 활성을 유도한다고 한다(Yel 등, 1999).

광학현미경적 관찰결과 정상군에서는 중심정맥을 중심으로 하여 간세포가 일정한 배열코드를 이루고 있는 반면 카드뮴 처리 군에서는 시간에 따라. 세포가 부어오르고 호산성변화가 증가하며 세포핵이 진하게 염색되고 핵의 응고 및 분절이 증가하는 등 세포손상이 심해지는 것을 볼 수 있다. 카드뮴을 투여한 1일군에서 간세포의 핵과 세포질변성이 관찰되었으며, 7 일군에서는 이러한 변화가 매우 심해서 간세포 파괴가 많이 관찰되었다. 이것은 간 조직이 계속 손상을 받고 있으며 회복이 되지 않는다는 것을 알 수 있다. 이것은 Western blot analysis에서 세포자멸사가 시간경과에 따라 계속 진행되는 것과 일치하였다.

이상의 연구결과를 종합하면 SD흰쥐의 간조직에서 카드뮴에 급성폭로시 세포자멸사는 caspase 8을 경유하지 않는 Bid의 활성화와 Bax의 미토콘드리아 내에서의 발현증가에 따라 cytochrome c가 세포질내로 분비되었고, cytochrome c는 caspase 9 protease의 활성화를 유도하여 궁극적으로 caspase3 protease의 활성화와 함께 endonuclease를 활성화시켜 세포사멸 현상을 유도하는 것으로 사료된다.

즉, Cd 피폭에 의해 7일 이내의 급성기에 초래되는 SD흰쥐의 간세포 손상은

세포자멸사의 형태로 초래되며, 이는 노출 경과 시간 및 Cd의 폭로양에 의존하였으며 Bcl-2 감소와도 관련되었다. 그리고, 이때 초래되는 세포자멸사는 caspase 8의 변화가 없어 death-receptor를 경유하지 않는 것으로 사료되고 Bid 및 Bax의 활성화에 따른 cytochrome c 방출과 연관되어 caspase-dependent pathway 보다는 mitochondrial-dependent pathway와 관련된 것으로 판단된다(Fig 15). 그러나 앞으로의 연구과제로서 세포내 신호전달체계에서 중요한 역할을 담당하는 그 전 단계에서의 다른 기작을 규명하고 세포자멸사에 관여하는 p53, 세포내 칼슘, MAP kinase 및 NF-kβ 등과의 관계에 대한 연구와 7일 이후의 장기노출에 따른 간세포 손상시와 어떤 차이가 있는가 등 추가적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

Ⅴ. 결론

카드뮴의 주요한 표적장기이며 만성 및 급성 폭로시 축적되는 가장 중요한 장기인 간의 세포독성작용기전을 파악하고자 SD흰쥐에 카드뮴을 피하주사하여 체중변화, 혈중 AST 및 ALT 변화, 간조직내 caspases, Bax, Bid, PARP, Bcl-2 및 cytochrome-c 단백질의 활성과 발현을 Western blot 및 면역조직화학적 조사분석을 통하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 카드뮴 투여시 시간 및 용량 의존적으로 체중이 감소하였다.

2) 카드뮴 투여시 AST와 ALT는 시간 및 용량 의존적으로 증가하였다.

3) Western blot 분석상 카드뮴 투여 시간경과 및 용량 증가에 따른 caspase 3, caspase 9, Bax, Bid, PARP은 감소하였으며, caspase 3, Bid와 PARP은 cleaved form이 관찰되었고 cytosol Bax는 감소하는 반면 mitochondrial Bax는 증가하였다. 그러나 caspase 8은 아무런 변화가 없었다. Bcl-2는 감소하였으며 cytochrome-c는 세포질 내에서는 감소하는 반면 미토콘드리아에서는 증가하였다.

4) 카드뮴을 처리 후 1 일군부터 간세포의 핵과 세포질의 변성이 관찰되었으며, 이는 시간 경과에 따라 더욱 심해져 7 일군에서는 이러한 변화가 매우 심해져 간세포 파괴가 많이 관찰되었다.

5) 카드뮴 처리 후 면역염색에서 Bax의 발현이 시간에 따라 증가하였다.

이상의 결과는 카드뮴 중독 SD흰쥐에서 초래되는 간세포 세포자멸사는 caspase-8의 관여없이 일어나 death-receptor를 경유하지 않는 것으로 사료되고, 세포질내에 있는 Bid의 활성화 및 세포질내 Bax가 미토콘드리아내로 이동되어 결국 미토콘드리아내 cytochrome c가 세포질내로 방출되어 caspase-3 및 -9 protease의 활성화가 초래되어 초래되는 것으로 판단된다.

Ⅵ. 참고문헌

Alnemri ES, Livingstone DJ. Nicholson DW, Salvesen G, Thornverry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. Cell 1996;87:171

Azzouri BEI, Tsanaris GT, Pellegrini O, Manuel Y, Benveniste J, Thomas Y. Cadmium induces apoptosis in human T cell line. Toxicol 1994;88:127-139

Allen RT, Cluck MW, Agrawal DK. Mechanism controling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspase. Cell Mol Life Sci. 1998;54:427-445.

Axelesson B, Darhlgren SE, Piscator M. Renal lesions in the rabbit after long term esposure to cadmium. Arch Environ Health 1968;17:24-28.

Blenis J. Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90:5889-92.

Beyersmann D, Hechtenberg S. Cadmium gene regulation and cellular sinaling in mammailan cells. Toxicol Appl Pharmacol 1997;144:247-261.

Cohen JJ, Apoptosis. Immunol Today 1993;14:126-130.

Chen WJ, Body R, Motilet NK. Some effects of continuous low-dose congenital exposure to methylmercury on organ in the rat fetus. Teratology 1979;20:31-6.

Cherian MG, Ferguson PJ. Metallothionein cytotoxicity and genotoxicity of metals. In: Hadjiliadis ND. Heavy Metals related to Human Environment. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht pp217-229, 1997.

Corocoran GB. Fix I, Jones DP, Treninen-Mosen M, Nicotera P, Oberhanmmer FA, Buttyan R. Apoptosis: molecular control point in toxicity, Toxicol Appl Pharmacol

1994;128:169-181.

Dieter MP, Luster ML, Boorman GA, Jameson CW, Dean JH, Cox JW. Immunological and biochemical responses in mice treated with mercuric chloride. Toxicol Appl Pharmacol 1983;68:218-228.

Dudley RE, Svoboda DJ, Klaassen Cd. Acute exposure to cadmium causes severe liver injury in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol 1982;65:302-313.

Dudley RE, Svoboda DJ, Klaassen Cd. Time-course of cadmiu-induced ultrastructural changes in rat liver, Toxicol Appl Pharmacol 1984;76:150-160.

Enari M, Talanian RV, Wong WW, Nagata S. Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. Nature 1996 ;380:723-6.

El Azzouzi B, Tsangaris GT, Pellegrini O, Manuel Y, Benveniste J, Thomas Y. Cadmium induces apoptosis in a human T cell line. Toxicology. 199411;88:127-39.

Fukuno H, Hirai M, Hsueh YM, Yamann Y. Effect of zinc peroxidation in the rat kidney. Toxicol Appl Pharmacol 1984;73:395-401.

Friberg L, Kjellstrom T, Rahnster B. Mortality and cacer morBidity among Cadmoum-expesed Workers. Envion Health Perspect 1979;28:199-204.

Foulkes EC. Cadmium Handbook Experimental Pharmacology, Vol. 80, Springer-Verlag, New York. 1986.

Fadell B, Orrenius S, Zhivotovsky B. Apotosis in Human Disease: A new skin for the old ceremony. Biochem Biophys Res Comm 1999;266-401.

Fleischer M, Sarofim AF, Fasset DW. Environmental impact of cadmium: A review by the panel on hazadous trace substances. Environ Health Perspect 1974:7:253-323.

Flick DF, Kraybill HF, Dimitroff JM. Toxic effects of cadmium: A review. Environ Res 1971:4:71-85.

Goyer, RA. Toxic effexts of metals. In Amdur MO, Klaassen Cd(Eds.), Casarett and Doull's Toxicology. 4th Ed., Pergamon Press Inc., New York, 1991;634-638.

Gross A, Korsmeyer SJ, Harada H, Zha J, Wang K, Yin XM, Wei M, Zinkel S. Death and survival signals determine active/inactive conformations of pro-apoptotic Bax, BAD, and Bid molecules. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1999;64:343-50.

Herr I, Wilhelm D, Bohler T, Angel P, Debatin KM. Activation of Cd95 (APO-1/Fas) signaling by ceramide mediates cancer therapy-induced apoptosis. EMBO J 1997;16:6200-8.

Hultberg B, Andersson A, Isalsson A. Alterations of thiol metabolism in human cell lines induced by low amounts of copper, mercury of cadmium ions. Toxicology 1998;126:203-212.

Halliwell B, Gutteridge JM. The definition and measurement of antoxidants in biological systems. Free Radic Biol med 1995;18:125-126.

Habeebu SS, Liu J, Liu Y. Klaassen Cd.Susceptibility of MT-null mice to chronic CdCl2-induced nephrotoxicity indicates that renal injury is not mediated by the CdMT complex. Toxicol Sci. 1998;46:197-203.

Hirata Y, Adachi K, Kiuchi K. Activation of JNK pathway and induction of apoptosis by manganese in PC12 cells. J Neurochem. 1998;71:1607-15.

Jeong SH, Habeebu SS, Klaassen Cd. Cadmium decreases gap junctional intercellular communication in mouse liver. Toxicol Sci 2000;57:156-66.

Kayanoki Y, Fujii J, Islam KN, Suzuki K, Kawata S, Matsuzawa Y, Taniguchi N. The protective role of glutathione peroxidase in apoptosis induced by reactive oxygen species. J Biochem (Tokyo). 1996;119:817-22.

Klaus SO, Davide F. Apoptosis, Biochem Biophysic Res Com 1993;190:1097-1103.

Kotsonis FN, Klaassen Cd. Toxicity and distribution of cadmium administered to rats at sublethal doses. Toxicol Appl Pharmacol 1977;41:667-680.

Lohmann RD, Beyersmann D. Cadmium and zinc mediated changes of the Ca^{2+} dependent endonuclease in apoptosis. Biochem Biophysic Res Com 1993;190:1097-1103.

Lu J, Kaeck M, Jiang C, Wilson AC, Tompson HJ. Selenite induction of DNA strand breaks and apoptosis in mouse leukemic L1210 cells. Biochem Pharmacol 1994;47:1531-1535.

Mailman O. Heavy metal. In: Guthrie FE, Perry JJ(Eds), Introduction to environmental toxicology. Elsevier North Hollan. Inc., New York, pp34-43, 1980.

Nath KA, Croatt AJ, Likely S, Behrens TW, Warden D. Renal oxidant injury and oxidant response induced by mercury. J Kidney International 1996;50:1032-1043.

Nordberg GF, Nishivama k. Adsorption and elution of cadmium on hair. Arch Envion Health 1972;25:92-96.

Oteiza PI, Adonaylo VN, Keen CL. Cadmium-induced testes oxidative damage in rats can be influenced by dietary zinc intake. Toxicology. 1999 1;137:13-22

Ochi T, Otsuka F, Takahashi K, Ohsawa M. Glutathione and metallothionein as cellular defense against cadmium toxicity in cultured Chinese hamster cells. Chem Biol Interact 1988;65:1-14.

Rao MS, Yelandandi AV, Subbarao V, Reddy JK. Role of apoptosis in copper deficiency-induced pancreatic involution in the ret. Am J Pathol 1993;142:1952-1957.

Shaikh ZA, Lucis OJ. Biological differences in cadmium and zinc turnover, Arch Emuiron Environ Health 1972;24:410-418.

Tzirogiannis KN, Panoutsopoulos GI, Demonakou MD, Hereti RI, Alexandropoulou KN, Basayannis AC, Mykoniatis MG. Time-course of cadmium-induced acute hepatotoxicity in the rat liver: the role of apoptosis. Arch Toxicol 2003;77:694-701.

Thuvander A, Sundberg J, Oskarsson A. Immunomodulating effects after perinatal exposure to methylmercury in mice. Toxicology 1996 Dec 2;114:163-75.

Wyllie AH, Kerr JER, Currie AR. Cell death: The signigicance of cell death. Int Rev Cytol 1980;68:251-306.

Wang Z, Templeton DM. Induction of c-fos protooncogene in mesangial cells by cadmium. J Biol Chem 1998;273:73-79.

Widmann C, Gibson S, Johnson GL. Caspase dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. J Biol Chem 1998;273:7141-7147.

Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effect of ERK and JNK-P38 MAP kinases on apoptosis Science 1995;270:1326-1331.

Yel L, Aggarwal S, Gupta S. Cartilage-hair hypoplasia syndrome: increased apoptosis of T lymphocytes is associated with altered expression of Fas (Cd95), FasL (Cd95L), IAP, Bax, and Bcl-2. J Clin Immunol. 1999;19:428-34.

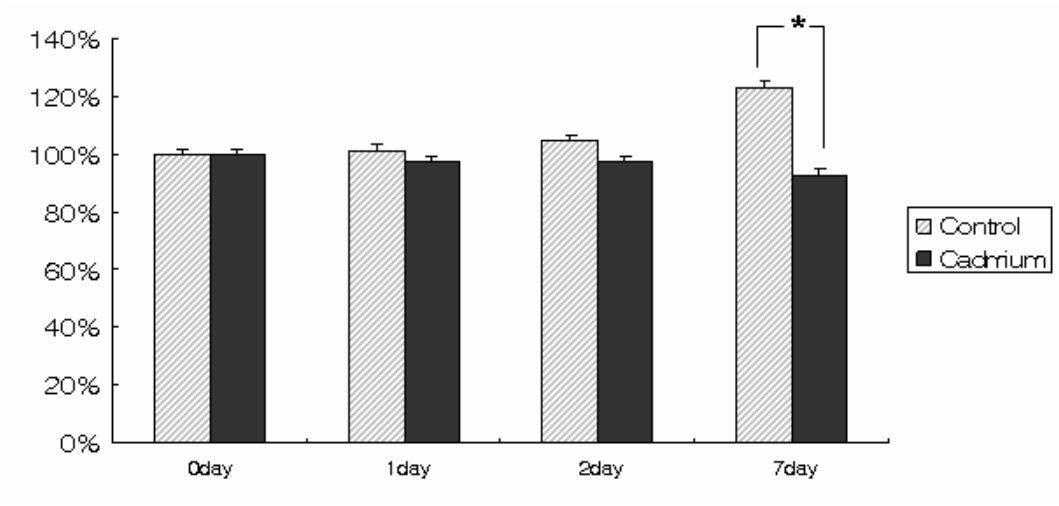

Figure 1

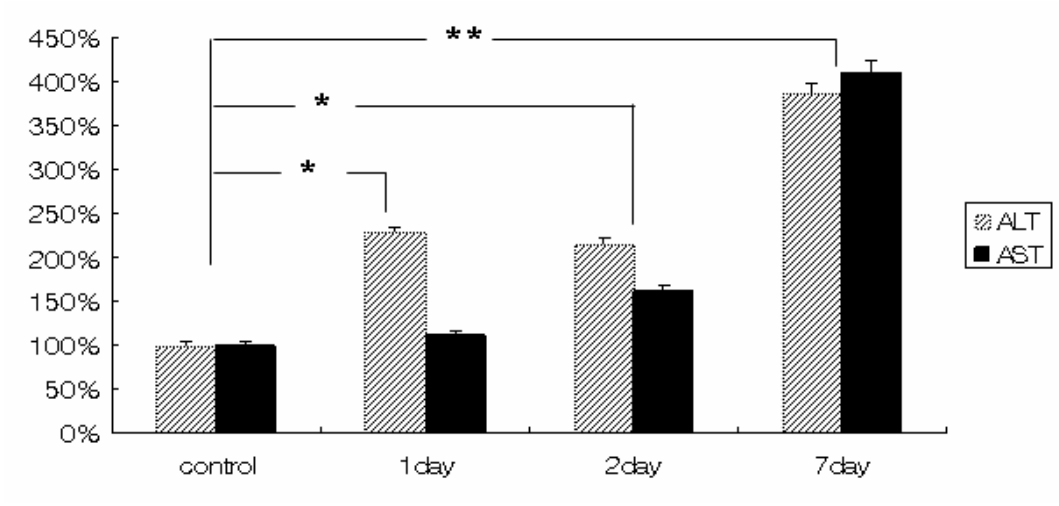

Figure 2

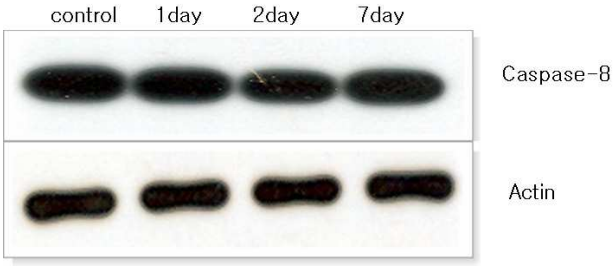

Figure 3

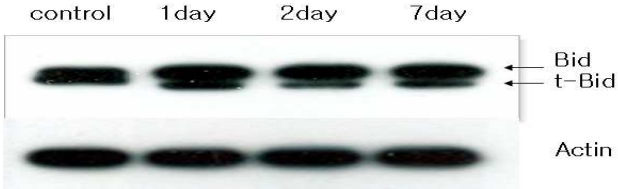

Figure 4

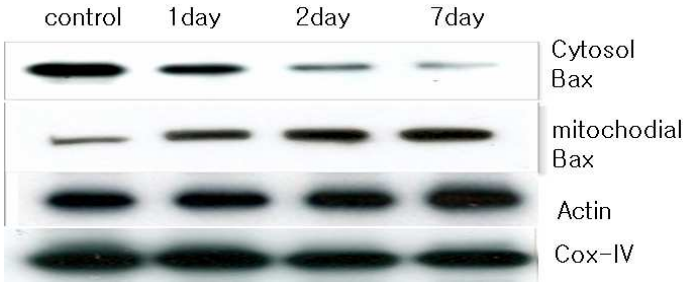

Figure 5

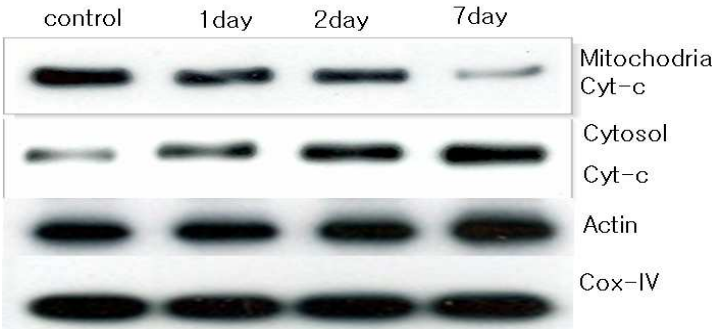

Figure 6

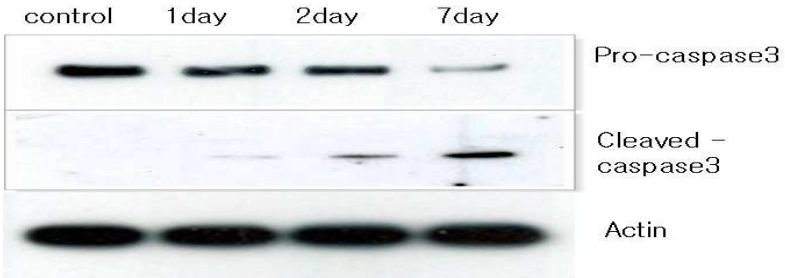

Figure 7

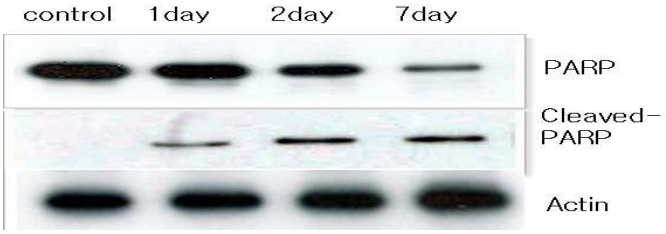

Figure 8

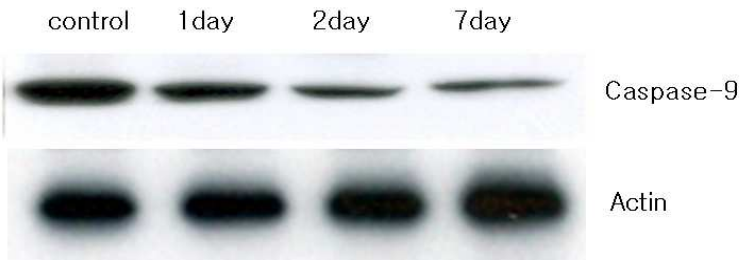

Figure 9

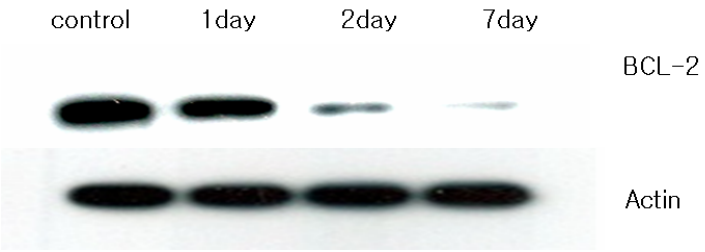

Figure 10

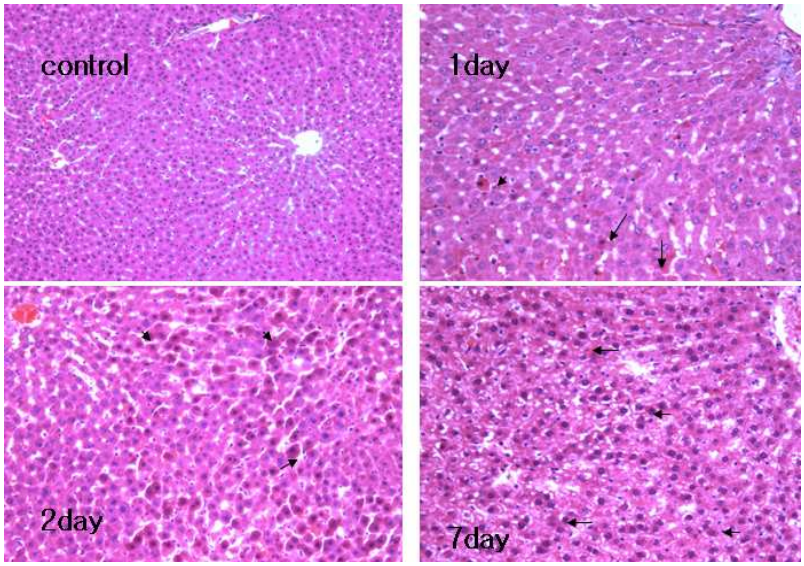

Figure 11

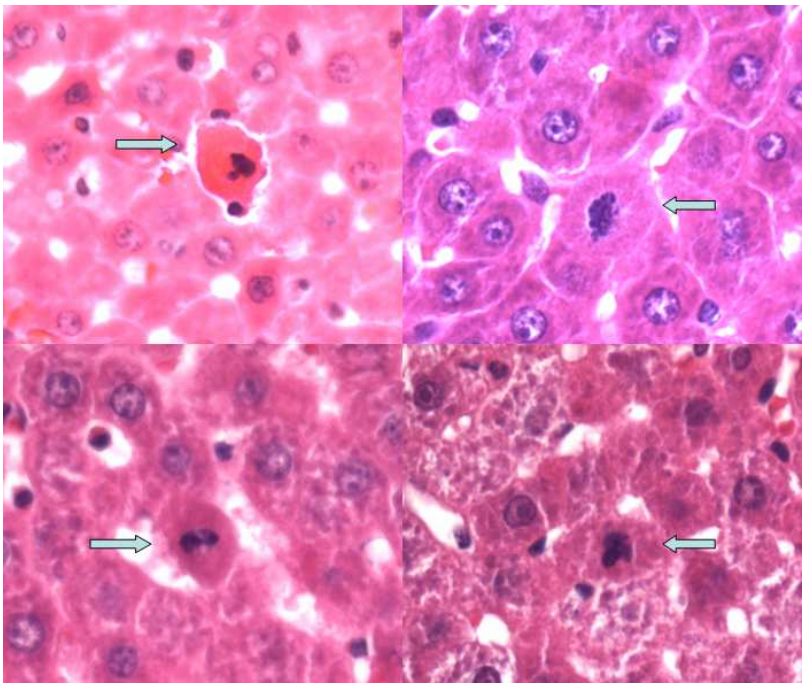

Figure 12

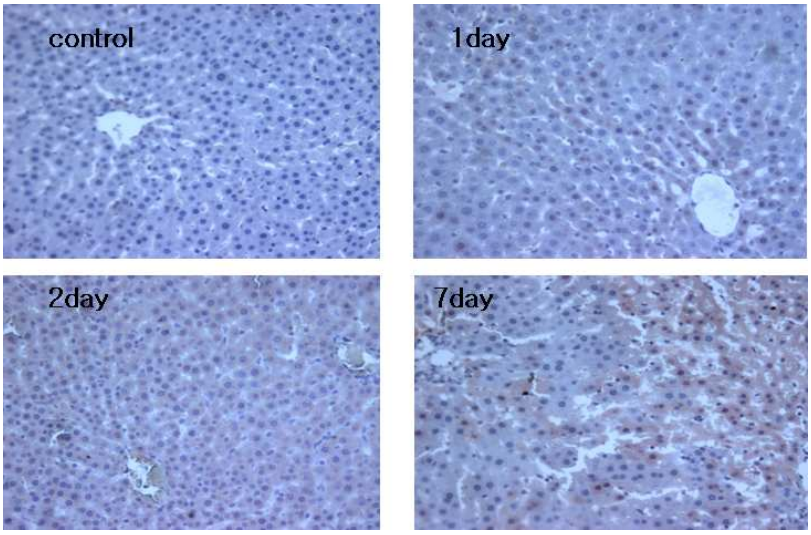

Figure 13

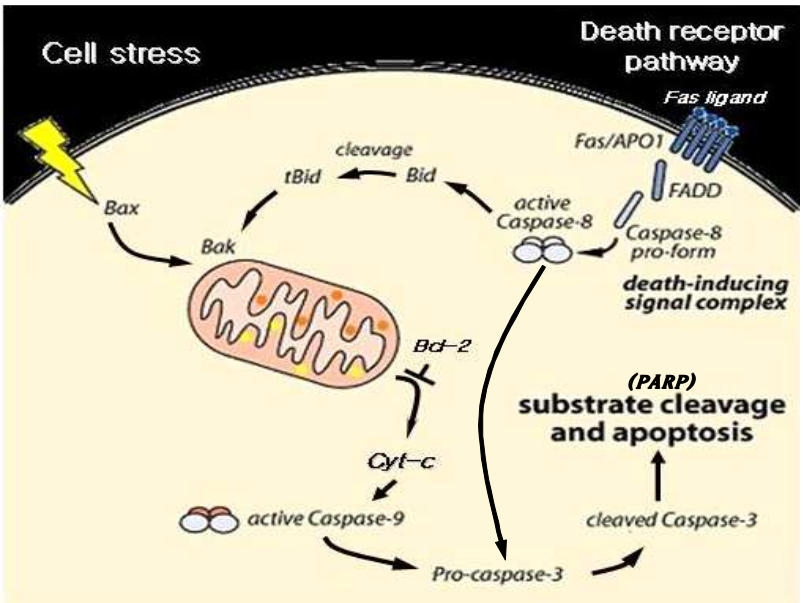

Figure 14

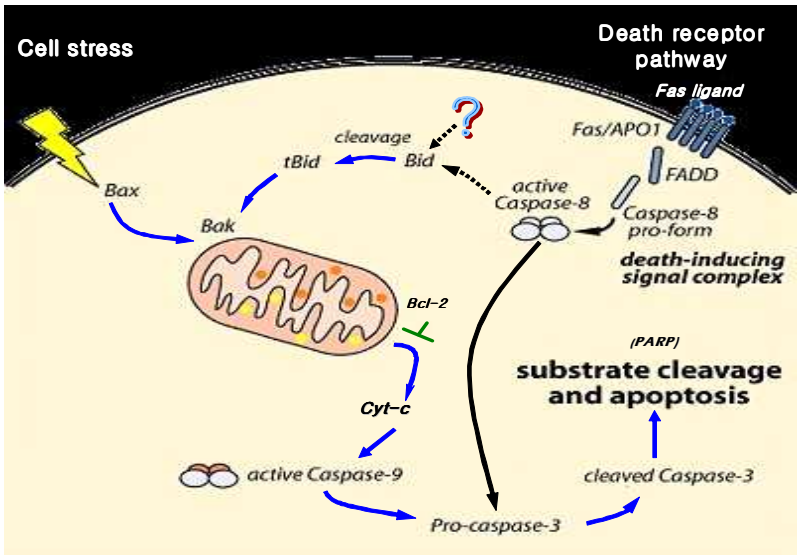

Figure 15