

## 흰쥐 조직에서의 카드뮴 결합 고분자량 단백질 [Cd-BP(II)]의 유도

천기정\* · 김봉희#

\*한국원자력연구소, 충남대학교 약학대학  
(Received August 19, 1999)

### Induction of Cd-binding High Molecular Weight Protein [Cd-BP(II)] in Rat Tissues

Ki-Jung Chun\* and Bong-Hee Kim#

\*Korea Atomic Energy Research Institute,  
College of Pharmacy, Chung Nam National University

**Abstract** — The study was carried out on the biochemical characters of Cd-BP(II) after isolation and purification of the protein from the liver of rat ip injection with Cd. A continued study has been doing whether Cd-BP(II) could be induced by Cd or by the other metals such as Zn and Cu. Antisera were made against the antigen of Cd-BP(II) from New Zealand white rabbits. We carried out g-globulin purification, then Ouchterlony test and gel immunodiffusion test. Cd-BP(II) was also found in normal tissues of rat. It was induced up to a considerable level by Cd, whose induced level was higher than that Cu or Zn treatment. The level of induction by Cu or Zn pretreatment plus Cd treatment was lower than that by single treatment of Cu or Zn. Such a result was presumably related to the Cd toxicity.

**Keywords** □ Cd-binding high molecular weight protein, Ouchterlony test, gel immunodiffusion test, Cd administration.

중금속중 카드뮴의 독성은 맹독한 것으로 알려져 있다. 동물실험에 밝혀진 것을 보면 빈혈, 고혈압, 단백뇨, 골연화증, 고환계양 및 위축 등을 들 수 있다. 사람의 경우는 고혈압, 단백뇨, 폐기종, 무후각증, 고환위축, 골연화증, 심장 혈관질환, 호흡기 질환 및 Itai Itai 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다. 자연계에서의 카드뮴은 보통 아연과 공존하며 인간의 필수원소가 아니나 체내에 축적되는 경향이 있으며 더욱이 사람에게 있어 약 20년의 생물학적 반감기를 갖고 있는 가장 독성이 높은 환경 오염원으로 알려져 있다.<sup>1)</sup>

생체내 효소계중에서의 metallothionein(MT)은 여러 중금속과 결합하여 중금속을 sequester하는 것으로 알려져 있는데 세포질내에서 MT는 특히 카드뮴을

sequester하는 카드뮴 결합 단백질로 알려져 있다.<sup>2)</sup> 그러나 세포내에서 MT와 결합되지 않은 카드뮴은 대개 high molecular weight protein(HMWP)분획에서 나타나며 이들은 세포의 장애를 초래하여 카드뮴 독성을 유발하는 것으로<sup>3)</sup> MT보다 카드뮴과 가장 높은 친화력을 갖는 생물학적 성분이나 단백질이 독성을 유발하는 표적분자일 가능성을 암시하고 있다.<sup>4)</sup>

따라서 본연구는 카드뮴과 친화력이 높은 고분자량 단백질인 Cd-BP(II)이 카드뮴에 의해 어느정도 유도되며 그밖에 2가 중금속인 구리 및 아연에 의해서도 유도되는지의 여부 및 카드뮴 투여전에 아연 및 구리 선투여가 Cd-BP(II)의 유도에 어떠한 영향을 미치는지를 밝히고자 함이 연구의 목적이다. 그러므로 분리정제한 Cd-BP(II)를 항원으로하여 토끼에 면역을 주어 항혈청을 얻어 정량적으로 gel immunodiffusion 실험을 통하여 조직내의 Cd-BP(II)의 분포도를 관찰하였다.

# 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 042-821-5935 (팩스) 042-821-5903

## 실험방법

**실험동물** - 각그룹당 체중 200 g 전후 숫컷 Sprague Dawley를 5마리씩으로하여 사육실에서 ad libitum 하게 사료를 주면서 실온에서 사육하면서 실험 하였다.

### 중금속 투여

**카드뮴 투여** - 카드뮴은  $CdCl_2 \cdot 2H_2O$ 를 사용하여 Cd 1 mg/kg body wt.로 intraperitoneal(ip) 주사로 1일 1회, 연속 3일간 주사후 24시간 경과한 후에 간, 콩팥, 허파, 심장, 지라 및 고환조직을 적출하였다.

**아연 또는 구리 투여** - 아연은  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 사용하여 Zn 10 mg/kg body wt.로 주사하였고 구리는  $CuSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 사용하여 구리 2.5 mg/kg body wt.로 상기 카드뮴 투여 방법과 동일하게 실시하였다.

**아연, 구리 선투여 및 카드뮴 투여** - 상기 아연 및 구리의 용량을 3일간 선투여한 후 상기 카드뮴 용량을 3일간 투여하여 상기 6가지 조직을 적출하였다.

**시료의 조제** - 각각의 조직을 10 mM phosphate buffer(pH 7.0)으로 4°C에서 glass homogenizer로 균질화 시킨후 eppendorf tube에 넣어 원심분리(Eppendorf centrifuge 5414, Brinkmann)하여 상층액을 시료로 사용하였다.

**단백질 정량** - 단백질 농도의 정량은 Bradford방법<sup>5)</sup>에 따라 측정하였다. Coomassie brilliant blue G 100 mg을 95% ethanol 50 ml와 85%(W/V)  $H_3PO_4$  100 ml를 섞어 완전히 녹인 다음 증류수로 1,000 ml로 희석시켜 사용하였으며 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준단백질 곡선은 bovine serum albumin을 사용하였다.

**Polyclonal antibody의 생산 및 Ouchterlony 실험** - Polyclonal 항체 형성을 위하여 NewZealand 백색 자성 토끼를 전주 우석의대로 부터 구입하여 사용하였다. DEAE-Sepharose 및 S-Sepharose chromatography로부터 분리한 단백질을 재차 denaturing SDS-PAGE를 행하였다. 여기서 분리된 밴드를 gel상에서 올려내어 마쇄한 후 10 mM phosphate buffer(pH 7.0)완충액에 1일간 passive elution시킨 후 cut off 3,000 dalton의 Amicon membrane을 이용하여 ultrafiltration하고 다시 10 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 다시 washing하여 농축시켰다. 농축시킨 단백질

300 µg을 암컷의 NewZealand white rabbit에 Freund's complete adjuvant(Difco)와 동량 혼합하여 1주일 간격으로 토끼의 넓적다리 근육에 4회 주사하고 토끼의 귓끝 1/3부근의 정맥에서 소량의 혈액을 시험 채취하여 Ouchterlony test로 항체 형성여부를 확인한 다음 1주후에, 즉 단백질 주사 시작 5주후에 심장 천자법(heart puncture)으로 혈액을 채취하고 상온에서 clotting 시킨 후 냉동원심분리기(Sorval RC 5B)로 3,500 rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다.

**γ-globulin의 정제** - 혈청에 동량의 35% saturated ammonium sulfate(pH 7.0)를 가해 포화시켜 4°C에서 2시간 방치후 15,000×g에서 20분간 원침하여 상층액의 albumin을 제거하고 침전물을 10 mM의 phosphate buffered saline(pH 7.0)에 녹였다. 상기 조작을 2번 반복한 후 침전물을 10 mM phosphate buffer용액에서 4°C에서 overnight동안 dialysis를 실시하여 crude γ-globulin을 얻었다. 이것을 DEAE-Sepharose column (2 cm×20 cm)을 통과시켜 용출된 분획을 cut off 10,000 dalton의 Amicon membrane으로 ultrafiltration한 후 denaturing SDS-PAGE를 실시하여 하나의 밴드를 확인한 다음 사용하였다.

**Western blotting** - 10% SDS-PAGE로 단백질을 분리한 다음 gel과 니트로셀룰로오스를 이전 완충액(15.6 mM Tris, 120 mM glycine)에 적신 후, 완충액에 적신 Whatman 3 MM 여과지를 밑에 깔고 그위에 니트로셀룰로오스와 gel 및 Whatman 3 MM여과지를 순서대로 덮고 기포를 제거시킨다. Bio-RAD의 semi dry transfer로 30분간 25 V로 단백질을 이전시켰다. 단백질이 이전된 니트로셀룰로오스는 3% BSA/TBS(2M Tris-HCl, 4M NaCl)로 1시간 blocking한 후 10분간 TBS로 3회 세척하였고, 1st antibody (항체가 1:10,000)를 1:100으로 희석하여 1시간 반응시켰다. 반응후 TBS로 10분간 3회 세척한 다음 peroxidase가 결합된 goat-anti-rabbit IgG(Sigma, 희석배율 1:1,000)로 1시간 반응시켰다. 뒤이어 TBS로 30분간 세척한 후 developing reagent(1 ml 3% chloronaphtol, 10 ml 100% methanol, 39 µl TBS, 30 µl 30%  $H_2O_2$ )로 2~3분 반응시켜서 면역 반응을 수행하였다.

**Gel immunodiffusion실험** - 항원은 카드뮴을 주사한(1.0 µg/kg body wt.) 흰쥐의 간, 콩팥, 고환, 지라 등을 카드뮴 주사 24시간후에 적출하여 10 mM

phosphate buffer, pH 7.0을 가하여 glass homogenizer로 균질화한 후 Eppendorf tube에 넣어 원심 분리하고 상등액을 취하여 항원으로 사용하였다. 항체는 상술한 정제된  $\gamma$ -globulin을 사용하였다. 1% agarose(in barbital buffer, pH 8.6, ionic strength 0.02) 10 ml를 40~50°C 까지 식히고 항체 100  $\mu$ l를 가하여 잘 혼합한 후 유리판(7×7 cm)에 도포하였다. Agarose가 응고하면 직경 2.5 mm의 구멍을 일정 간격으로 뚫고 항원을 15  $\mu$ l씩 넣었다. 그다음 유리판을 밀폐된 용기에 넣고 실온에서 24시간 이상 반응시켰으며 phosphate buffered saline(0.85%)에 하루동안 투석한 후 염색은 50% methanol과 7% acetic acid 용액에 녹인 0.125% Coomassie brilliant blue로 60°C에서 2시간동안 염색하여 10% acetic acid, 50% methanol용액으로 탈색시켜 침강부위의 직경을 계산하여 단백질의 생성량을 비교하였다.

**실험결과 및 고찰**

**Western blotting 및  $\gamma$ -globulin의 정제** - Cd-BP(II)를 SDS-PAGE하여 니트로 셀룰로오스에 이전시킨 후 항 Cd-BP(II) 항체로 Western blotting을 실시한 결과는 Fig. 1과 같다. Fig. 1에서와 같이 Cd-BP(II)의 항원에 대한 항 Cd-BP(II) 항체가 형성되었음을 확인하였다. Cd-BP(II)의 항원형을 얻어 감마글로브린을 정제하여 전기 영동한 결과는 Fig. 2와 같다. 이 그림은 Cd-BP(II)를 항원으로하여 얻은 혈청과 정제한 감마글로브린의 전기 영동상을 나타내는 것으로 감마 글로브린을 제외한 알부민 및 그밖의 성분이 제거되었음을 나타내고 있다.

**Cd-BP(II)의 조직내 유도 및 분포** - Cd-BP(II)에 대하여 기존조직내의 존재여부(Fig. 3)와 카드뮴에 의해 새롭게 유도생성되는지 여부(Fig. 4)를 정성적으로 확인하기 위하여 생체조직과 Cd-BP(II)의 항체를 이용하여 Ouchterlony test를 실시하였다. Fig. 3 및 Fig. 4에서와 같이 정상 및 카드뮴 투여군에서의 모든 조직에서 항원-항체의 침강반응이 관찰되었다. 그러므로 Cd-BP(II)은 카드뮴에 의해서 새롭게 유도되는 단백질이 아니고 기존 조직에도 존재하는 단백질을 알 수 있었다. 이 단백질의 조직내 분포를 정량적으로 알기 위하여 우선 Cd-BP(II)항원과 항Cd-BP(II)감마글로브린을 사용하여 gel immunodiffusion을 실시한 후 침

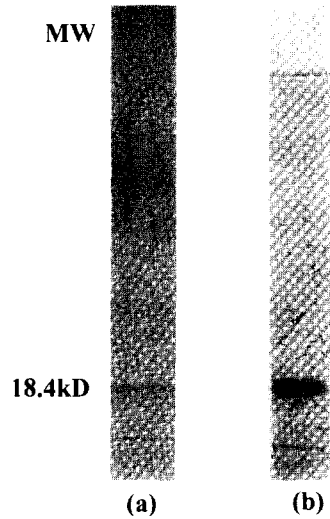


Fig. 1 - Western blot of Cd-BP(II). (a) SDS-PAGE of purified Cd-BP(II) (b) Western blot of Cd-BP(II) probed with anti-Cd-BP(II).

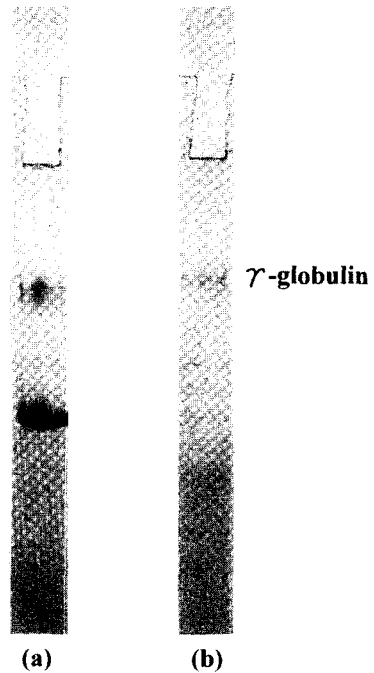
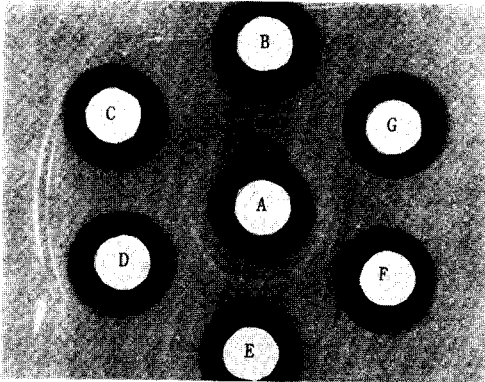
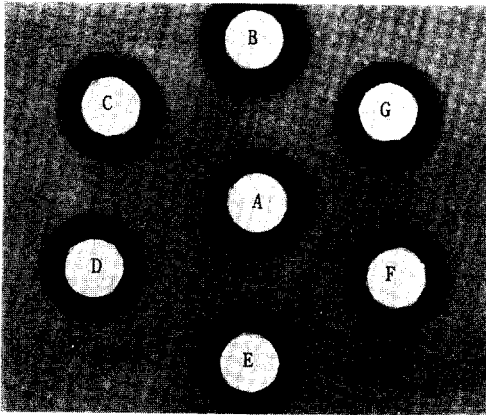


Fig. 2 - Purification of  $\gamma$ -globulin from rabbit anti Cd-BP(II) serum. (a) SDS-PAGE of rabbit anti Cd-BP(II) serum (b) SDS-PAGE of purified  $\gamma$ -globulin from (a).

강부위의 직경과 항원량을 갖고 표준곡선을 그려준 결과는 Fig. 5와 같다. Fig. 5에서와 같이 침강부위의 직경과 항원량은 거의 비례적이었으며 이 표준곡선을

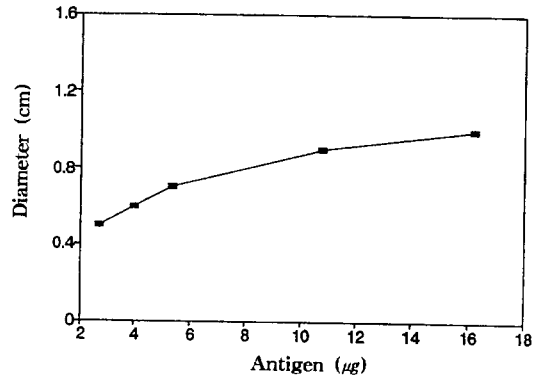


**Fig. 3** – Ouchterlony double immunodiffusion of Cd-BP(II) in normal tissues of rats. Well A contains anti Cd-JBP(II) serum; B, kidney supernatant; C, lung supernatant; D, testis supernatant; E, liver supernatant; F, spleen supernatant; G, heart supernatant.

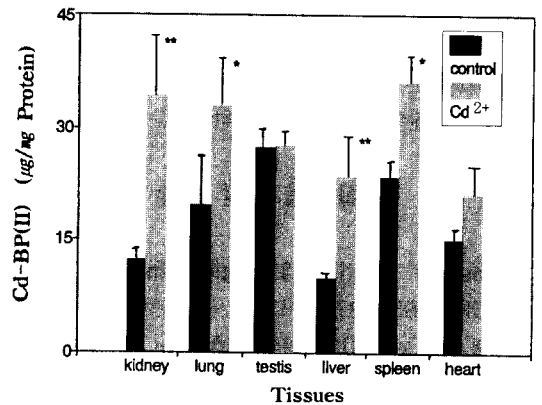


**Fig. 4** – Ouchterlony double immunodiffusion of Cd-BP(II) in various tissues of rat after Cd<sup>2+</sup> treatment. Well A contains anti Cd-BP(II) serum; B, kidney supernatant; C, lung supernatant; D, testis supernatant; E, liver supernatant; F, spleen supernatant; G, heart supernatant.

이용하여 Cd-BP(II)의 조직내 분포량을 계산해 주었다. 또한 흰쥐의 간, 콩팥, 허파, 심장, 고환, 지라의 조직에서 Cd-BP(II)의 양을 실험한 결과, 카드뮴을 투여치 않은 정상조직에서의 양은 Fig. 6과 같다. Fig. 6에서와 같이 Cd-BP(II)의 양은 역시 모든 조직에 두루 존재하고 있으며 특히 고환조직에서의 양이 많았으며 간과 콩팥에서 함유량이 적었다. 카드뮴을 연속 3일간 투여한 경우, 간을 비롯한 6가지 조직에서 Cd-BP(II)의 양은 Fig. 6에서와 같이 콩팥, 간과 지라 조직에서 약간의 유도를 나타낸 반면 고환에서는 거의



**Fig. 5** – Standard curve of Cd-BP(II) antigen of radial immunodiffusion.



**Fig. 6** – Amount of Cd-BP(II) in various tissue of rat after Cd<sup>2+</sup> treatment. Data represent mean±SE from 5 experiments, \*: p<0.05, \*\*: p<0.01.

유도가 없었다. 그밖에 2가의 필수원소인 구리만을 연속 3일간 투여하여 구리에 의해 Cd-BP(II)이 유도되는가를 관찰한 결과, Fig. 7에서와 같이 간, 고환, 콩팥에서는 약간의 유도를 나타내나 특히 지라 및 허파에서는 상당히 유도 증가를 나타내었다. 생체내에 2가의 가장 필수원소인 아연만을 연속 3일간 투여하여 아연에 의해 Cd-BP(II)가 유도되는가를 관찰한 결과, Fig. 8에서와 같이 거의 모든 조직에서 유도정도가 비슷하여 정상치의 2배 정도로 증가되었으며 이중 콩팥과 간에서의 유도가 많았다. 그외에 구리를 선투여후 카드뮴을 투여한 조직 내에서의 Cd-BP(II)의 양을 관찰한 결과는 Fig. 9에서와 같이 간, 지라, 콩팥 및 고환에서 약간의 유도를 나타내었으나 특히 허파에서 상당히 유도 증가를 나타내었다. 아연을 선투여 후 카드뮴을 투여시 조직 내에서의 Cd-BP(II)의 양을 관찰한

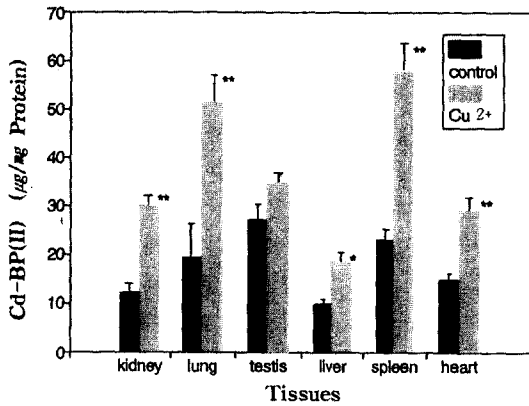


Fig. 7 - Amount of Cd-BP(II) in various tissue of rat after Cu<sup>2+</sup> treatment. Data represent mean±SE from 5 experiments, \*: p<0.05, \*\*: p<0.01.

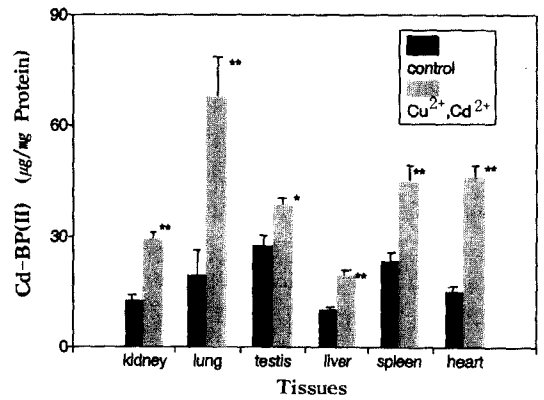


Fig. 9 - Amount of Cd-BP(II) in various tissue of rat by Cu<sup>2+</sup> pretreatment and Cd<sup>2+</sup> treatment. Data represent mean±SE from 5 experiments, \*: p<0.05, \*\*: p<0.01.

결과, Fig. 10에서와 같이 모든 조직에서 아연만을 투여한 군과 유사한 결과를 나타내었다. Winge와 Rajagopalan<sup>6)</sup>에 의하면 흰쥐에 카드뮴은 연속 투여한 후 카드뮴과 결합되는 단백질에 관한 연구결과, 조직 내에 카드뮴량이 증가되므로써 MT가 생성되기 이전 또는 카드뮴이 특별한 레벨에 도달하여 MT와 결합된 후 용해성 고분자량의 단백질 분획과 결합되는 것으로 보고하고 이는 MT가 최대로 유도되어 카드뮴 결합 장소가 포화됨을 의미하며 반면 과량의 카드뮴은 다른 민감한 단백질과 결합됨을 의미할 수 있다고 보고하였으며 카드뮴이 MT이외의 단백질과의 결합은 카드뮴 독성의 초기 양상일 수 있을 것으로 추정하기도 하였다. 또한 Squibb와 Cousins<sup>7)</sup>은 카드뮴 투여전 cycloheximide와 actinomycin D를 투여하여 카드뮴이

결합되는 단백질의 분자량과 카드뮴량을 관찰한 결과, 카드뮴이 특이한 mRNA를 형성하는 세포대사를 경유하여 카드뮴 결합 단백질의 새로운 합성을 촉진함을 보고하였다. 이와같이 카드뮴 결합 단백질 합성이 actinomycin D와 cycloheximide에 의해 억제될 때나 흰쥐에 카드뮴을 대량 주사했을 때<sup>6)</sup> 금속이 간에서 용해성 고분자량 단백질 분획과 결합되는 것은 카드뮴이 critical threshold level아래에서는 카드뮴이 MT와 결합하여 독성을 억제하며 이 레벨 이상에서는 고분자량 단백질 분획에서 검출되는데 이는 잇따른 생리적인 변화의 첫번째 요인일 수 있으며 이 분획은 카드뮴 독성대사에 크게 기여할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 Min 등<sup>8)</sup>에 의하면 카드뮴 독성은 조직의 농도와 관계없이 화학형태에 의존되어 MT는 세포독성이 없

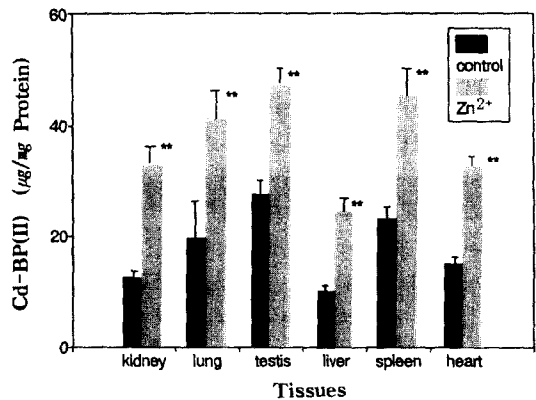


Fig. 8 - Amount of Cd-BP(II) in various tissue of rat after Zn<sup>2+</sup> treatment. Data represent mean±SE from 5 experiments, \*\*: p<0.01.

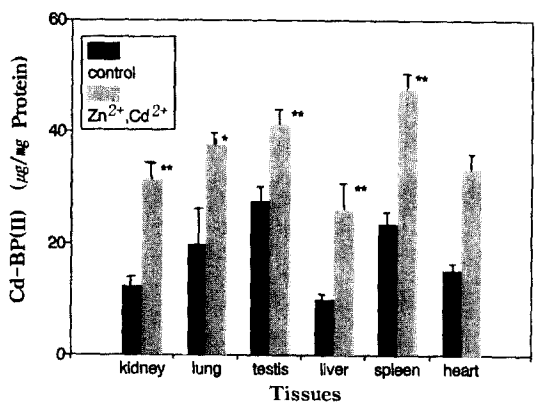


Fig. 10 - Amount of Cd-BP(II) in various tissue of rat by Zn<sup>2+</sup> pretreatment and Cd<sup>2+</sup> treatment. Data represent mean±SE from 5 experiments, \*: p<0.05, \*\*: p<0.01.

는 것으로 보고하고 있으나 Cd-MT를 직접 투여할 경우 nephropathy의 장애를 초래하였는데 이는 Cd-MT가 분해되어 MT로부터 방출된 2가 이온의 카드뮴에 기인된 것으로 보고하고 있다.<sup>9)</sup>

그밖에 Chen과 Failla<sup>10)</sup>는 hepatic MT의 분해는 lysosomal과 nonlysosomal compartment 두곳에서 일어남을 보고하고 있어 MT가 분해되어 방출되는 금속이 세포질내 다른 고분자량 단백질과 결합될 가능성은 매우 높다. MT는 여러 금속에 대한 친화력이 각기 다르기 때문에 하나의 금속은 단백질과 친화력이 낮은 다른 금속과 치환될 수 있으므로 이미 존재하는 Cd-MT의 카드뮴은 세포내의 bioavailability에 영향을 줄 수 있으므로 MT gene transcription과 단백질 합성 유도 능력에 영향을 줄 수 있다.<sup>11)</sup> 또한 카드뮴과 수은같은 중금속의 독성 억제 방안으로 아연 선투여 방법이 제시되어 왔는데<sup>12,13)</sup> 이러한 아연 유도 내성은 MT합성과 연관이 있는 것으로 생각되며 하나의 가능성 있는 대사는 아연을 미리 투여하여 합성된 Zn-thionein에서 아연과 카드뮴이 치환될 수 있다.<sup>14)</sup> 또한 MT대사에서 아연의 중요성이 상당히 보고되고 있는데 아직까지 MT대사에서 아연 역할이 명확치는 않지만 MT의 생물학적 기능중의 하나가 perinatal development동안 고등동물에서 주요한 아연 저장 단백질로 보고하고 있으며<sup>15)</sup> 아연 대사에 관여할 지 모름을 제안하기도 하였다.<sup>16)</sup> 이는 아연이 MT 구조의 유지 및 turnover를 컨트롤하는데 중요한 역할을 나타내고 있다. 이와같이 카드뮴은 아연 뿐만 아니라 2가의 필수원소인 구리와 생체내 대사에 서로 많이 관여할 것으로 사료된다. 본 실험결과, Cd-BP(II)는 기존조직에 존재하는 단백질로 생체내에서 중요한 역할을 하는 단백질로 카드뮴 투여에 의해 각조직에서 다소 증가되는 경향이 있었으며 카드뮴 투여전에 구리 및 아연 선투여는 카드뮴 투여보다 유도량의 감소를 나타내고 있어 구리 및 아연이 카드뮴 독성에 방어 효과를 갖고 있음을 알 수 있었으며 카드뮴 유도 고분자량 단백질의 유도 생성은 조직내에 존재하는 필수 원소에 크게 좌우됨을 알 수 있었다.

## 결 론

카드뮴 유도 고분자량 단백질 Cd-BP(II)이 아연이나 구리와 같은 중금속을 복강 주사한 흰쥐의 여러 조직

에서 유도되는 가를 관찰한 결과, 정상적인 동물의 기존 조직에 모두 함유하고 있었으며 함유량은 교환, 지라, 허파, 심장, 콩팥 그리고 간의 순서였으며 10 µg~28 µg/mg protein 함유량을 나타내어 생체에서 중요한 역할을 할것으로 사료되며 카드뮴과 아연 처리 시에는 대체로 콩팥이나 간에서 많이 유도되었으며 구리 처리시에는 허파, 지라 및 심장에서 많이 유도되는 경향을 나타내었고 구리가 아연보다 유도가 잘 되었다. 따라서 본 단백질은 정상조직에도 존재하며 카드뮴 이외에 아연 및 구리에서도 유도되므로 이 단백질의 유도 합성은 카드뮴이 절대적이 아님을 알 수 있었다.

## 문 헌

- 1) Morselt, A. F. W.: Environmental pollutants and disease: A cell biological approach using chronic cadmium exposure in the animal model as a paradigm case. *Toxicology* **70**, 1(1991).
- 2) Kagi, J. J. R. and Kojima, Y.: *Chemistry and biochemistry of metallothionein*. In *Experientia Supplementum Vol 52 Metallothionein* pp. 25-61. Birkhauser Verlag, Basel (1987).
- 3) Muller, L.: Consequences of cadmium toxicity in rat hepatocytes: mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. *Toxicology* **40**, 285 (1986).
- 4) Sunaga, H., Yamane, Y., Aoki, Y. and Suzuki, K. T.: Different distribution of cadmium in the liver supernatant between *in vivo* and *in vitro*. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharm.* **74**, 215 (1991).
- 5) Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248 (1976).
- 6) Winge, D. R. and Rajagolalan, K. V.: *Cadmium in the environment*. CRC press division chemical rubber company. Cleveland. (1972).
- 7) Squibb, K. S. and Cousins, R. J.: Studies on the synthesis of cadmium binding protein using 109Cd, 115Cd, and 14C in liver and kidney. *Fed. Proc.* **32**, 924 (1973).
- 8) Min, K. S., Hatta, A., Onosaka, S., Ohta, N., Okada, Y. and Tanaka, K.: Protective role of renal metallothionein against Cd nephropathy in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **88**, 294 (1987).

- 9) Min, K. S., Kobayashi, K., Onosaka, S., Ohta, N., Okada, Y. and Tanaka, K. : Tissue distribution of cadmium and nephropathy after administration of cadmium in several chemical forms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **86**, 262 (1986).
- 10) Chen, M. L., and Failla, M. L. : Degradation of zinc-metallothionein in monolayer cultures of rat hepatocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **191**, 130 (1989).
- 11) Scheuhammer, A. M., Onosaka, S., Rodgers, K. and Cherian, M. G. : The interaction of zinc and cadmium in the synthesis of hepatic metallo-thionein in rats. *Toxicology* **36**, 101 (1985).
- 12) Yamane, Y., Fukino, H. and Imagawa, M. : Suppressive effect of zinc on the toxicity of mercury. *Chem. Pharm. Bull.* **25**, 1509 (1977).
- 13) Gunn, S. A., Gould, T. C. and Anderson, W. A. D. : Mechanisms of zinc, cysteine and selenium protection against cadmium-induced vascular injury to mouse testis. *J. Reprod. Fertil.* **15**, 65 (1968).
- 14) Tanaka K., Onosaka, M. D. and Okahara, K. : Substitution of zinc bound to metallothionein for cadmium *in vitro* and *in vivo*. *Eisei Kagaku* **23**, 229 (1977).
- 15) Gallant, K. R. and Cherian, M. G. : Changes in dietary zinc result in specific alterations of metallothionein concentrations in newborn rat liver. *J. Nutr.* **117**, 709 (1987).
- 16) Bremner, L., and Davies, N. T. : Zinc proteins in rat liver. Second International symposium on trace element metabolism in animals, Madison, Wisc. University Park Press, Baltimore (1973).