

랫드 간세포 일차배양에서 셀레늄이 카드뮴에 의해 유도된 독성 및 지질과산화에 미치는 영향

임태진*

상지대학교 생명자원과학대학 생명공학과
(2003년 2월 12일 접수, 2003년 4월 16일 수리)

The Effects of Selenium on Cadmium-Induced Toxicity and Lipid Peroxidation in Rat Hepatocyte Primary Culture

Tae-Jin Rhim (Department of Biotechnology, College of Life Science and Natural Resources, Sangji University, Wonju 220-702, Korea)

ABSTRACT : The objective of present study was to investigate the antioxidative and hepatoprotective effects of selenium on cadmium-induced toxicity and lipid peroxidation in rat hepatocyte primary culture. To do this, two separate experiments were conducted. In Experiment 1, primary cultures of rat hepatocytes were incubated for 6 hr in the presence of various concentrations (1, 10, 50, 100, and 500 μM) of cadmium chloride. Cytotoxicity and lipid peroxidation were evaluated using the MITT assay and TBARS assay, respectively. Antioxidative and hepatoprotective effects were determined by measuring the activity of GOT and GSH-Px, respectively. Cell viability was reduced and lipid peroxidation was increased by cadmium in dose-dependent manners. There was significantly negative correlation ($r = -0.943$, $p < 0.01$) between cell viability and lipid peroxidation. GOT activity was increased and GSH-Px activity was decreased by cadmium at the concentration of 50 μM . In Experiment 2, primary cultures of rat hepatocytes were incubated for 6 hr in the presence of 100 μM of cadmium chloride and various concentrations (0.01, 0.1 and 1 ppm) of sodium selenite to assess the effect of selenium on cadmium-induced toxicity and lipid peroxidation. Cell viability and GSH-Px activity were increased by sodium selenite at the concentration of 1 ppm. Whereas, lipid peroxidation and GOT activity were reduced by 0.1 ppm of sodium selenite. These results demonstrate that selenium has an antioxidative and hepatoprotective potentials against cadmium.

Key words: cadmium, selenium, antioxidative, hepatoprotective, rat hepatocyte.

서 론

카드뮴(cadmium)은 독성이 매우 강한 유해 중금속의 하나로써, 산업 오염, 식품 오염 및 흡연 등 각종 환경 오염의 증가에 따른 카드뮴 중독이 심각한 문제로 대두되고 있다.

카드뮴은 섭취 또는 흡입에 의해 체내로 쉽게 유입되며, 대부분은 간, 신장, 정소 및 뇌 등에 장기간 축적되어¹⁾, 체성장 감소²⁾, 헤모글로빈 농도 저하³⁾, 혈중 글루코스 농도 증가⁴⁾, 지질과산화(lipid peroxidation) 촉진⁵⁾, 항산화 방어기전 저해⁶⁾, 생식능력 감소⁷⁾ 등 심각한 생화학적·생리학적인 장애를 야기시키는 것으로 보고되어 있다.

셀레늄(selenium)은 토양내 무기태 형태로 존재하는 필수 미네랄로써, 식물과 미생물에 의해 유기태 형태로 전환된다. 셀레늄은 불포화지방산으로부터 형성된 과산화물을 대사하는 항산화효소인 glutathione peroxidase (GSH-Px)의 구성성분으로, 주로 간에 작용하여 항산화 방어 역할을 한다⁸⁾. 일반적으로 셀레늄은 비타민 E와 상호 협조적으로 생체내 항산화 기능을 수행한다. 또한, 셀레늄은 갑상선호르몬 대사과정 중 요오드를 제거하는 효소(deiodinase)의 구성성분이다.

랫드를 이용한 실험에서 카드뮴은 superoxide dismutase, catalase 및 GSH-Px 등 항산화 방어계와 관련된 대부분의 효소들의 활성을 감소시켰으나^{9,11)}, 셀레늄은 카드뮴에 의해 감소된 이들 항산화 효소의 활성을 증가시켰다고^{9,11)} 보고되고 있다. 카드뮴은 지질과산화물의 해독과 세포의 기능 보호에 주요한 역할을 수행하는 glutathione S-transferase(GST)의 활성을

*연락처:

Tel: +82-33-730-0544 Fax: +82-33-730-0503
E-mail: tjrhim@mail.sangji.ac.kr

증가시켰으나, 셀레늄은 카드뮴에 의해 증가된 GST의 활성을 감소시키지는 못하였다고¹¹⁾ 보고되고 있다. 또한, 랫드에서 카드뮴은 시간 및 농도 의존적으로 정소에 축적되어 지방산화를 촉진하였으며, 셀레늄은 카드뮴에 의해 유도된 중금속 축적과 지방산화를 억제하였다고¹²⁻¹⁴⁾ 보고되고 있다.

이와 같이 셀레늄의 카드뮴 간독성 및 산화에 미치는 효과에 관한 수많은 연구들은 대부분 *in vivo* 실험에 의해 수행되었다. 그러나 카드뮴 단독 투여시 간내 카드뮴의 축적이 증가될 뿐만이 아니라 셀레늄의 축적도 증가하였고¹¹⁾, 반면에 셀레늄 투여에 의해 카드뮴의 축적도 증가하였다는 연구결과¹²⁾도 보고된 바 있으며, 간세포 일차배양으로 셀레늄의 카드뮴에 의해 유발된 독성 및 산화 억제 효과는 거의 보고된 바 없다. 따라서 카드뮴으로 유발되는 독성 및 산화에 대한 셀레늄의 항산화 및 간보호 효과를 정확히 이해하기 위해서 본 연구에서는 간세포 일차배양을 통해 카드뮴에 의한 셀레늄의 간세포 독성 및 산화에 대한 보호를 조사하였다.

재료 및 방법

실험동물

(주)대한바이오링크(충북 음성)로부터 구입한 체중 180~200 g의 Sprague-Dawley 수컷 랫드를 실험동물로 사용하였다. 본 실험실에서 사료와 물은 무제한 공급하며 1주일의 적응기간을 거친 다음 간세포배양을 실시하였다.

간세포배양

간세포 일차배양은 Seglen¹⁵⁾의 collagenase perfusion 방법을 기초로 하여 다음과 같이 실시하였다. 실험동물에 urethane (1 g/kg BW) 0.6~1.0 mL을 복강주사하여 마취시킨 뒤 37°C로 가온된 collagenase-free, Ca²⁺·Mg²⁺-free HBSS buffer를 이용하여 관류에 의해 혈액을 간으로부터 유출시킨 후 간세포를 분리하였다. 얻어진 간세포는 hemacytometer에 점적하여 세포 생존율과 세포수를 측정 후 세포수를 2.5×10⁵ cells/mL 이 되도록 WME 배양액으로 희석하였다. Cell suspension을 24-well 또는 6-well culture plate에 각각 1 mL 또는 3 mL 씩 분주한 후 CO₂ incubator에 넣고 37°C에서 4시간 배양하였다. Serum-free WME 배양액으로 2번 세척하여 well에 부착되지 않은 세포들을 제거하고 overnight 배양한 다음, 처리 용액(무첨가, 카드뮴, 카드뮴+셀레늄 등)을 포함한 새로운 WME 배양액을 첨가하여 CO₂ incubator에 넣고 37°C에서 6시간 배양하였다.

효소 활성

배양후 배양액을 채취하여 4°C에서 3,000 rpm으로 5분간 원심분리하였고, 상등액을 취하여 측정시까지 -20°C에서 보관하였다. Glutamic oxaloacetic transaminase(GOT) 활성은 Reitman과 Frankel¹⁶⁾의 방법에 따라 측정하였다.

GSH-Px 활성을 측정하기 위해, culture plate에 부착되어

있는 세포를 policeman으로 분리시킨후 PBS 용액으로 suspension시켰고, Lii 등¹⁷⁾의 방법에 따라 초고속원심분리를 실시하여 세포질 상등액을 채취하여 측정시까지 -80°C에 보관하였다. GSH-Px 활성은 H₂O₂를 기질로 사용하여 Lawrence와 Burk¹⁸⁾의 방법에 따라 측정하였으며 mg 단백질당 표기하였다. GOT와 GSH-Px 활성은 각각 처리군별 4반복하여 측정하였다.

Thiobarbituric Acid Reactive Substances(TBARS) assay

지질과산화는 배양액의 TBARS를 측정함으로써 결정하였다. 배양후 배양액을 채취하여 4°C에서 3,000 rpm으로 5분간 원심분리하였고, 상등액을 취하여 측정시까지 -20°C에서 보관하였다. TBARS 수준은 Uchiyama와 Mihara¹⁹⁾의 방법을 수정한 Foretz 등²⁰⁾의 방법에 따라 처리군별 4반복하여 측정하였다. TBARS 농도는 532 nm에서 흡광도를 측정하여 표준용액으로 사용한 malonaldehyde bis 농도로 표기하였다.

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay

간세포의 생존, 증식 및 활성은 MTT assay에 의해 결정하였다. 배양액 채취후 culture plate에 부착되어 있는 세포를 분리시킨 다음 PBS 용액으로 suspension시켜 Mosmann²¹⁾의 방법에 따라 MTT assay를 실시하였다. 처리군의 MTT값은 대조구를 100%로 기준하여 표시하였다.

단백질 정량

단백질 함량은 BSA를 표준시약으로 사용하여 Bradford²²⁾의 방법에 따라 측정하였다.

자료분석 및 통계처리

처리군별 평균 효소 활성, TBARS 수준 및 MTT값은 일원 분산분석을 사용하여 조사하였으며, 처리효과가 인정되는 경우 처리군별 평균값의 차이는 Student-Newman-Keuls' test²³⁾를 사용하여 p<0.05에서 유의성을 조사하였다.

결과 및 고찰

MTT assay는 노란색의 가용성 tetrazolium 염이 살아있는 세포의 미토콘드리아 succinate dehydrogenase에 의해 파란색의 불용성 formazan 생성물로 환원되는 원리를 이용한 실험 방법으로, 미토콘드리아의 활성 및 세포 생존율의 지표로 사용되고 있다. 다양한 농도의 카드뮴이 간세포 생존율에 미치는 효과는 Table 1과 같았다. 카드뮴의 농도가 증가함에 따라 간세포 생존율이 감소하여, 세포독성이 증가하였다는 것을 나타내고 있다. 특히, 10 μM 이상의 카드뮴 농도에서 간세포 생존율이 유의적으로 감소하였으며, 100 μM의 농도에서는 세포 생존율이 44%로 감소되었다. 이와 같은 카드뮴의 세포독성으로 인한 세포생존율 감소효과는 이미 발표된 연구결과^{24,25)}와

Table 1. Effects of various concentrations of cadmium on cytotoxicity and lipid peroxidation in primary cultures of rat hepatocytes

Groups CdCl ₂ (μM)	% MTT reduction	TBARS (nM)
0	100 ± 5.4 ^a	0.30 ± 0.04 ^a
1	91 ± 2.8 ^a	0.48 ± 0.05 ^{ab}
10	79 ± 4.9 ^b	0.65 ± 0.06 ^b
50	67 ± 3.2 ^c	1.08 ± 0.11 ^c
100	44 ± 2.7 ^d	1.85 ± 0.06 ^d
500	14 ± 2.6 ^e	2.83 ± 0.15 ^e

Hepatocytes were cultured for 6 h in the presence of CdCl₂. Cytotoxicity was assessed with the MTT assay and demonstrated by decreases in MTT reduction. Results of MTT assay are expressed as percent of control values. Lipid peroxidation was determined from the production of TBARS. Values are presented as the means±SE derived from four determinations. ^{a,b,c,d,e}Values in the same column with different superscripts are significantly different (p<0.05).

일치하고 있다.

다양한 농도의 카드뮴이 지질과산화에 미치는 효과는(Table 1) 카드뮴 무첨가군과 비교해 볼 때, 카드뮴의 처리 농도가 증가함에 따라 TBA reactant의 형성도 증가되어, 카드뮴이 농도 의존적으로 지질과산화를 증가시켰음을 나타내 보이고 있고, 특히 50 μM 이상의 카드뮴 농도에서 지질과산화가 현저히 증가되었다. 이와 같이 카드뮴이 간세포에서 지질과산화를 증가시킨다는 본 연구결과는 이전에 발표된 연구결과^{24,28)}와 일치한다. 또한, 카드뮴 처리에 따른 TBARS 농도와 %MTT 감소간의 상관분석을 실시한 결과 지질과산화와 세포생존율과는 매우 밀접한 상관관계 (Pearson 상관계수=-0.943, p<0.01)가 있음이 나타났다.

카드뮴 농도 변화에 따른 간세포 배양액의 GOT 활성은 (Table 2) 카드뮴 농도가 증가함에 따라 증가하였으며, 특히 50 μM 이상의 카드뮴은 GOT의 활성을 현저히 증가시켜, 간 손상이 유발되었음을 알 수 있었다.

GSH-Px는 glutathione을 산화시킴으로써 hydrogen peroxide를 물로 환원시켜, 세포의 과산화물 수준을 조절하는 중요한 기능을 하는 효소이다. 다양한 농도의 카드뮴으로 6시간 처리한 결과 간세포의 GSH-Px 활성변화는(Table 2) 카드뮴의 농도가 10 μM까지는 영향을 미치지 않았지만, 50 μM 이상의 농도에서 카드뮴은 GSH-Px의 활성을 현저히 감소시켰으며, 500 μM 농도에서는 50% 이상의 감소를 나타내었다. 그러나 카드뮴이 GSH-Px의 활성에 미치는 영향에 관해서는 카드뮴은 GSH-Px의 활성을 억제^{29,30)} 또는 GSH-Px의 활성에 아무런 영향을 미치지 못하였다고^{28,31,32)} 보고되고 있어 상반된 결과를 보였다. 이와 같이 카드뮴이 GSH-Px의 활성에 미치는 효과의 차이점은 실험설계, 세포배양 조건 등의 차이에 기인한 것으로 사료된다.

Table 2. Effects of various concentrations of cadmium on the activities of GOT and GSH-Px in primary cultures of rat hepatocytes

Groups CdCl ₂ (μM)	GOT (IU/L)	GSH-Px (nmol NADPH oxidized/min/mg protein)
0	18 ± 1.5 ^a	301 ± 14.8 ^a
1	26 ± 1.5 ^a	285 ± 6.1 ^a
10	32 ± 1.8 ^{ab}	265 ± 15.0 ^{ab}
50	44 ± 2.2 ^b	231 ± 20.6 ^b
100	79 ± 4.6 ^c	171 ± 12.1 ^c
500	161 ± 10.7 ^d	138 ± 10.3 ^c

Hepatocytes were cultured for 6 h in the presence of CdCl₂. Values are presented as the means±SE derived from four determinations. ^{a,b,c,d}Values in the same column with different superscripts are significantly different (p<0.05).

셀레늄이 카드뮴에 의한 세포독성, 지질과산화, 효소활성 등에 미치는 효과를 조사하기 위해, 다양한 농도(0.01, 0.1, 1 및 10 ppm)의 셀레늄(sodium selenite)으로 6시간 배양하여 셀레늄이 간세포 생존율에 미치는 예비실험을 실시하였다. 1 ppm (약 6 μM)까지의 셀레늄 농도는 간세포 생존율에 아무런 영향을 미치지 않았으나, 10 ppm 농도에서는 간세포 생존율이 57% 정도 감소되어 세포독성을 나타내었다. 따라서 셀레늄이 카드뮴 독성에 미치는 효과에 관한 실험에서는 10 ppm의 농도는 제외하였다. 이러한 결과는 2 μM의 셀레늄이 간세포 생존율에 전혀 영향을 미치지 않았다는 연구결과³³⁾와도 유사하다.

셀레늄이 카드뮴에 의해 증가된 세포독성에 미치는 효과는(Table 3) 0.01 및 0.1 ppm의 셀레늄 수준에서는 아무런 영향을 미치지 못하였으나, 1 ppm의 셀레늄은 카드뮴에 의해 증가된 세포독성을 억제시켜 간세포 생존율을 증가시켰음을 알 수 있었다.

셀레늄이 카드뮴에 의해 증가된 지질과산화에 미치는 효과는(Table 3) 세포생존율의 경우와 유사하게, 낮은 수준의 셀레늄에서는 심각한 영향을 미치지 못하였으나, 1 ppm의 셀레늄은 카드뮴에 의해 증가된 지질과산화를 현저히 억제시켰다. 이처럼 셀레늄이 지질과산화를 억제하는 효과는 *in vivo* 실험에서도 보고된 바 있다. Othman과 El Missiry³⁴⁾는 랫드를 이용한 실험에서 셀레늄(10 μmole/kg) 투여가 납(lead) 투여에 의해 증가된 지질과산화를 대조군 수준으로 억제시켰다고 보고하였다.

셀레늄이 카드뮴에 의해 증가된 GOT 활성에 미치는 효과는(Table 4) 셀레늄 무첨가군에 비하여 셀레늄 0.1 및 1 ppm 첨가군에서 낮게 나타나, 셀레늄이 카드뮴에 의해 증가된 GOT 활성을 억제시켰음을 알 수 있었다. 이와 같이 셀레늄이 GOT 활성을 억제하는 효과는 *in vivo* 실험에서도 보고된 바 있다. Othman과 El Missiry³⁴⁾는 랫드를 이용한 실험에서 셀레늄(10 μmole/kg) 투여가 납(lead) 투여에 의해 증가된 GOT 활성을 대조군 수준으로 억제시켰다고 보고하였다.

Table 3. Effects of selenium on cytotoxicity and lipid peroxidation in primary cultures of rat hepatocytes exposed to 100 µM of cadmium.

Groups Se (ppm)	% MIT reduction	TBARS (nM)
control*	100 ± 3.5 ^a	0.35 ± 0.03 ^a
0	45 ± 3.2 ^b	1.85 ± 0.09 ^b
0.01	49 ± 1.7 ^b	1.75 ± 0.06 ^{bc}
0.1	56 ± 3.7 ^b	1.58 ± 0.09 ^c
1	81 ± 2.5 ^c	0.83 ± 0.09 ^d

Hepatocytes were cultured for 6 h in the presence of 100 µM of CdCl₂ and various concentrations of sodium selenite except in control group* where hepatocytes were maintained in the absence of cadmium and selenium. Values are presented as the means±SE derived from four determinations. ^{a,b,c,d}Values in the same column with different superscripts are significantly different (p<0.05).

셀레늄이 카드뮴에 의해 감소된 GSH-Px 활성에 미치는 효과는(Table 4) 낮은 수준의 셀레늄이 아무런 영향을 미치지 못하였으나, 1 ppm의 셀레늄은 카드뮴에 의해 감소된 GSH-Px 활성을 현저히 증가시켰다.

Table 3과 4에 나타난 바와 같이, 간세포배양에서 1 ppm의 sodium selenite 첨가는 카드뮴에 의해 증가한 지질과산화 및 GOT 활성을 감소시켰고, 반면에 감소된 세포생존율 및 GSH-Px 활성을 증가시켰다.

Selenomethione 또는 selenocystine과 같은 유기태 형태의 셀레늄이 selenite 또는 selenate와 같은 무기태 형태의 셀레늄보다 생체내 이용율이 훨씬 높은 것으로³⁵⁾ 알려져 있기 때문에, 본 실험에서도 유기태 셀레늄과 무기태 셀레늄의 효과를 비교 조사하였으나, 두 집단간의 효과 차이는 발견하지 못하였다. 셀레늄이 항종양효과에 미치는 연구에서도 무기태와 유기태 형태의 셀레늄 간에 효과 차이가 없다고 보고된 바 있다. Ehrlich ascites tumor cells로 접종한 마우스에 2 µg/BW 농도의 셀레늄 투여는 뚜렷한 종양억제효과를 나타내었으나, selenite나 sodium selenate 등의 무기태 셀레늄과 selenocystine이나 selenomethionine과 같은 유기태 셀레늄간에 차이는 없었다고³⁶⁾ 보고되고 있다. 이상의 연구 결과에 비추어 볼 때, 셀레늄이 GSH-Px의 활성을 증가시키고 이 증가된 GSH-Px가 카드뮴에 의해 유발된 지질과산화를 억제함으로써 항산화 및 간보호 효과가 나타난 것으로 사료된다.

요 약

본 연구의 목적은 랫드 간세포 일차배양에서 카드뮴에 의해 유발된 세포독성 및 지질과산화에 대한 셀레늄의 항산화 및 간보호 효과를 조사하기 위함이다. 이를 위해 2개의 실험을 수행하였다. 실험 1에서는, 1, 10, 50, 100 및 500 µM의 다

Table 4. Effects of selenium on the activities of GOT and GSH-Px in primary cultures of rat hepatocytes exposed to 100 µM of cadmium.

Groups Se (ppm)	GOT (IU/L)	GSH-Px (nmol NADPH oxidized/min/mg protein)
control*	21 ± 2.1 ^a	310 ± 24.2 ^a
0	77 ± 4.4 ^b	181 ± 7.7 ^b
0.01	73 ± 2.2 ^{bc}	185 ± 6.5 ^b
0.1	65 ± 1.9 ^c	198 ± 6.3 ^b
1	45 ± 3.0 ^d	250 ± 7.1 ^c

Hepatocytes were cultured for 6 h in the presence of 100 µM of CdCl₂ and various concentrations of sodium selenite except in control group* where hepatocytes were maintained in the absence of cadmium and selenium. Values are presented as the means±SE derived from four determinations. ^{a,b,c,d}Values in the same column with different superscripts are significantly different (p<0.05).

양한 농도의 카드뮴으로 6시간 동안 간세포를 일차배양하였다. 간세포 생존율과 지질과산화는 각각 MIT 방법과 TBARS 방법으로 측정하였다. 항산화 효과와 간보호 효과는 각각 GOT와 GSH-Px 활성을 측정함으로써 결정하였다. 카드뮴은 농도 의존적으로 세포 생존율을 감소시켰으며 지질과산화는 증가시켰다. 세포 생존율과 지질과산화 간에 유의적인 음의 상관관계(r=-0.943, p<0.01)가 관찰되었다. 카드뮴은 50 µM 농도에서 GOT의 활성을 증가시켰으나 GSH-Px의 활성은 감소시켰다. 실험 2에서는 셀레늄이 카드뮴에 의해 유발된 독성 및 지질과산화에 대한 효과를 연구하기 위해 100 µM의 카드뮴과 0.01, 0.1 및 1 ppm의 다양한 농도의 셀레늄으로 6시간 동안 간세포 일차배양하였다. 세포 생존율과 GSH-Px의 활성은 1 ppm의 셀레늄에 의해 증가되었다. 반면에, 지질과산화와 GOT의 활성은 0.1 ppm의 셀레늄에 의해 감소되었다. 이러한 연구 결과는 셀레늄이 카드뮴에 대한 항산화 및 보호 효과를 나타내 보이고 있다.

감사의 글

본 연구는 2001년도 상지대학교 교내 연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. Samarawickrama, G. P. (1979) *Biological effects of cadmium in mammals*, In Webb M(ed):"The chemistry, biochemistry and biology of cadmium.", Elsevier-North Holland Biomedical Press, Amsterdam, p.341-422.
2. Rajanna, B., Hobson, M., Reese, J., Sample, E. and Chapatwala, K. D. (1984) Chronic hepatic and renal

- toxicity by cadmium in rats, *Drug Chem. Toxicol.* 7, 229-241.
3. Kunimoto, M., Miysaka, K. and Miura, T. (1986) Changes in membrane properties of rat blood cells induced by cadmium accumulating in the membrane fraction, *J. Biochem. Tokyo* 99,3 97-106.
 4. Chapatwala, K. D., Rajanna, B. and Desai, D. (1980) Cadmium-induced changes in gluconeogenic enzymes in rat kidney and liver, *Drug Chem. Toxicol.* 3, 407-420.
 5. Manca, D., Ricard, A. C., Trotter, B. and Chevalier, G. (1991) Studies on lipid peroxidation in rat tissues following administration of low and moderate doses of cadmium chloride, *Toxicology* 67, 303-323.
 6. Sarkar, S., Yadav, P., Trivedi, R., Bansal, A. K. and Bhatnagar, D. (1995) Cadmium-induced lipid peroxidation and the status of the antioxidant system in rat tissues, *J. Trace Element Med. Biol.* 9, 144-149.
 7. Dalton, T., Fu, K., Enders, G. C., Palmiter, R. D. and Andrews, G. K. (1996) Analysis of the effects of overexpression of metallothionein-I in transgenic mice on the reproductive toxicology of cadmium, *Environ. Health Persp.* 104, 68-76.
 8. Combs, G. F. Jr. and Combs, S. B. (1984) The nutritional biochemistry of selenium, *Ann. Rev. Nutr.* 4, 257-280.
 9. Jamall, I. S. and Smith, J. C. (1985) Effects of cadmium treatment on selenium-dependent and selenium-independent glutathione peroxidase activities and lipid peroxidation in the kidney and liver of rats maintained on various level of dietary selenium, *Toxicology* 64, 102-105.
 10. Olsson, U. (1986) Selenium deficiency and detoxication functions in the rat: Short-term effects of cadmium, *Drug-Nutr. Interact.* 4, 309-319.
 11. Ognjanovic, B., Zikic, R. V., Stajin, A., Saicic, Z. S., Kostic, M. M. and Petrovic, V. M. (1995) The effects of selenium on the antioxidant defense system in the liver of rats exposed to cadmium, *Physiol. Res.* 44, 293-300.
 12. Sugawara, N. and Sugawara, C. (1984) Selenium protection against testicular lipid peroxidation from cadmium, *J. Appl. Biochem.* 6, 199-204.
 13. Yiin, S. J., Chern, C. L., Sheu, J. Y. and Lin, T. H. (1999) Cadmium induced lipid peroxidation in rat testes and protection by selenium, *Biomaterials* 12, 353-359.
 14. Yiin, S. J., Chern, C. L., Sheu, J. Y., Tseng, W. C. and Lin, T. H. (1999) Cadmium-induced renal lipid peroxidation in rats and protection by selenium, *J. Toxicol. Env. Health* 57, 101-111.
 15. Seglen, P. O. (1976) Preparation of Isolated rat liver cell, *Methods Cell Biol.* 13, 29-83.
 16. Reitman, S. and Frankel. S. (1957) A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases, *Am. J. Clin. Pathol.* 28, 56-63.
 17. Lii, C. K., Wang, S. T., Chen, H. W. and Sheen, L. Y. (1996) Glutathione and glutathione-related enzyme activities of male and female rat hepatocytes under various culture conditions, *Arch. Toxicol.* 70, 822-829.
 18. Lawrence, R. A. and Burk, R. F. (1976) Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 952-958.
 19. Uchiyama, M. and Mihara, M. (1978) Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test, *Anal. Biochem.* 86, 271-278.
 20. Foretz, M., Foufelle, F. and Ferre, P. (1999) Polyunsaturated fatty acids inhibit fatty acid synthase and spot-14-protein gene expression in cultured rat hepatocytes by a peroxidative mechanism, *Biochem. J.* 341, 371-376.
 21. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63
 22. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
 23. Steel, R. G. D. and Torre, J. H. (1980) *Principles and Procedures of Statistics*, 2nd ed, McGraw-Hill, New York, p.186-187.
 24. Fariss, M. W. (1991) Cadmium toxicity: unique cytoprotective properties of alpha tocopheryl succinate in hepatocytes, *Toxicology* 69, 63-77.
 25. Pourahmad, J. and O'Brien, P. J. (2000) A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for Cu^{2+} and Cd^{2+} , *Toxicology* 143, 263-272.
 26. Stacey, N. H., Cantilena, Jr. L. R. and Klaassen, C. D. (1980) Cadmium toxicity and lipid peroxidation in isolated hepatocytes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 53, 470-480.
 27. Muller, L. and Ohnesorge, F. K. (1982) Different response of liver parenchymal cells from starved and fed rats to cadmium, *Toxicology* 25, 141-150.
 28. Muller, L. (1986) Consequences of cadmium toxicity in rat hepatocytes: Effects of cadmium of the glutathione-peroxidase system, *Toxicol. Lett.* 30, 259-265.
 29. Omaye, S. T. and Tappel, A. L. (1975) Effect of cadmium chloride on the testicular soluble selenoenzyme, glutathione peroxidase, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 12, 695-711.

30. Splittgerber, A. G. and Tappel, A. L. (1979) Inhibition of glutathione peroxidase by cadmium and other metal ions, *Arch. Biochem. Biophys.* 197, 534-542.
31. Black, R. S., Whanger, P. D. and Tripp, M. J. (1979) Influence of silver, mercury, lead, cadmium and selenium on glutathione peroxidase and transferase activities in rats, *Biol. Trace Element Res.* 1, 313-324.
32. Pool, M. L. (1981) Exposure and health effects of cadmium, Part 3. Effects of cadmium on enzyme activities, *Tox. Environ. Chem. Rev.* 4, 179-203.
33. Styblo, M. and Thomas, D. J. (2001) Selenium modifies the metabolism and toxicity of arsenic in primary rat hepatocytes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 172, 52-61.
34. Othman, A. I. and El Missiry, M. A. (1998) Role of selenium against lead toxicity in male rats, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 12, 345-349.
35. Laws, J., Latshaw, J. and Biggert, M. (1986) Selenium bioavailability in foods and feeds, *Nutr. Rep. Int.* 33, 13-24.
36. Greeder, G. A. and Milner, J. A. (1980) Factors influencing the inhibitory effect of selenium on mice inoculated with Ehrlich ascites tumor cells, *Science* 209, 825-827.