

랫드 심근세포유래 H₉C₂ 세포주에서의 망간화합물의 산화적스트레스 유도작용

박은정 · 박광식[#]

동덕여자대학교

(Received March 24, 2008; Revised June 2, 2008)

Induction of Oxidative Stress by Mananese Chloride in Cultured H₉C₂ Cells

Eun-Jung Park and Kwangsik Park[#]

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

Abstract — Manganese is a naturally occurring element which is widespread in the environment. Also, manganese is an essential trace element and plays a key role in important biological reactions catalyzed by enzymes. However, exposure to high levels of manganese can cause toxicity in neurone and inhalation system, also damage in various tissues. We investigated the toxicity induced by manganese compound (MnCl₂) in cultured rat cardiomyocytes. Treatment of manganese to cultured cardiomyocyte led to cell death, reactive oxygen species (ROS) increase, and cytosolic caspase-3 activation. The ROS increase was related with the decreased level of glutathione. Expressions of ROS related genes such as heme oxygenase-1, thioredoxin reductase, and NADH quinone oxidase were significantly induced in manganese treated cells. These results suggest that manganese induce oxidative stress and apoptosis in cardiomyocytes, and may be the one of risk factors to cause heart dysfunction *in vivo*.

Keywords □ manganese chloride, cytotoxicity, oxidative stress, cardiomyocytes

망간은 지구생성 초기부터 자연에 존재하는 미량 원소로서,¹⁾ 체폭제, 살균제, 촉매제, 건전지, 화학비료 등 산업분야에서 다양한 용도로 이용될 뿐만 아니라 체내에서 일어나는 생화학적 반응을 촉매하는 필수적인 원소이다.^{1,2)} 즉, 망간은 아미노산, 지질, 단백질, 탄수화물대사를 포함한 다양한 생리학적 과정의 정상적인 작동을 위해 필요하며 또한 면역계의 작동, 세포의 에너지 조절, 뼈와 결체조직의 성장 및 혈액응고 등에 중요한 역할을 담당하고 있다. 이밖에도 신경전달체의 합성과 대사에 관련된 효소뿐 만 아니라 항산화효소인 superoxide dismutase(SOD)를 포함한 다양한 효소의 보호소로서 작용하는 것으로 알려져 있다. 그러나 망간은 망간 광산에서 일하는 광부들에게서 추체외로증후군(extra-pyramidal syndrome)이라 불리는 신경독성이 동정된 150 여년 전부터 과다노출 시 신경독성을 일으키는 물질로 알려지게 되었다.³⁾

망간은 우리가 섭취하는 거의 모든 식품에 저농도로 함유되어 있다. 그러나 지금까지 보고된 역학 연구 자료를 통해서도 알 수 있듯이 대부분의 망간 중독 사례는 광부, 제련업자, 용접공, 건전지용 배터리 공장의 근로자 등 직업적으로 고농도의 망간을 흡입하는 근로자들에게서 발생되었으며, 식품에 함유된 저농도의 망간을 장기간 섭취함으로 인해 발생된 사례는 거의 보고된 바 없다. 독일의 한 건전지용 배터리 공장의 공기 중 망간 농도는 큐빅미터당 4~40 µg/l이었으며, 이 곳에서 근무하고 있는 근로자들의 혈액(3~26 µg/l)과 머리카락(0.4~50 mg/kg)에서는 일반인 보다 높은 농도의 망간이 검출되었다.⁴⁾ 이 밖에도 많은 역학 연구 자료가 근로자들에게서 나타나는 신경계 및 호흡기계의 기능 이상이 고농도의 망간노출과 의미있는 상관관계가 있다고 보고하고 있다.⁵⁻¹⁰⁾

체내 조직이나 기관은 유입된 독성물질이 과량인 경우 정도의 차이는 있으나, 모두 독성 영향을 받을 수 있으며, 망간의 경우도 주 대상기관인 뇌나 신경계를 비롯해 다양한 조직에 대한 독성이 발표된 바 있다. 즉, 망간의 과다한 조직내 축적은 운동 항진증, 만성파킨슨질환과 유사한 신경증상, 그리고 망간증과 같은

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-940-4522 (팩스) 02-940-4195
(E-mail) kspark@dongduk.ac.kr

신경행동학적 이상 외에도,³⁾ 수정 및 생식기능을 감소시키고,¹¹⁾ 간 및 신장에도 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다.¹²⁾

그러나 아직까지 망간이 질병을 발생시키는 메카니ズ에 대한 연구는 미흡한 상황이며, 특히 어느 정도의 농도에서 심근독성이 발현될 수 있는지에 대한 연구는 거의 보고된 바 없다.

이에 본 연구자는 랫드의 심근세포에서 유래한 H₉C₂ 세포주에 망간을 처리함으로써 망간의 독성정도 및 독성발현기전을 세포수준에서 연구해 보고자 하였다.

재료 및 방법

시약

Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)은 GIBCO Invitrogen(Seoul, Korea)제품을 구입하였고, 3-(4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide(MTT), Dichloro-fluorescein-diacetate(DCFH-DA), 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI), reduced glutathione, 및 ortho-phthaldialdehyde 등을 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하였다. Caspase-3 assay kit는 R&D systems Inc.(Minneapolis, MN, USA)에서, RNA isolation kit(RNAagents[®]) 및 Genomic DNA purification kit는 Promega Company(Madison, WI, USA)에서 구입하였으며 AccuPower RT/PCR Premix는 (주)바이오니아(Daejeon, Korea)에서 구입하였다.

세포배양

랫드의 심근에서 유래한 H₉C₂ cell line은 한국 세포주 은행으로부터 분양받아 10% FBS를 함유하는 DMEM배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 계대 배양하였다.

세포독성

계대 배양한 세포를 트립신 처리하여 회수한 후 무혈청 배지로 2회 세척하고, 96 well plates에 2×10⁴~5×10³ cells/ml씩 노출시간별로 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 부착시킨 후 200, 400, 800, 1600 μM의 망간화합물(MnCl₂)을 처리하고 각각 24, 48, 72, 96시간씩 노출시켰다. 노출시간이 종료되면 2 mg/ml의 MTT 용액을 well당 40 μl씩 넣고 배양기내에서 4시간 정도 반응시켰다. 배지를 제거하고 DMSO를 well당 150 μl씩 넣어 준 후 30분 정도 가볍게 흔들어 주고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 농도당 4 well씩 3회 이상 시험하였으며 각각의 흡광도를 대조군의 흡광도와 비교하여 백분율로 표시하였다.

세포내 ROS 측정

세포를 12 well plate에 2×10⁵ cells/ml로 분주하여 24시간 동

안 부착시킨 후 200, 400, 800, 1600 μM의 망간화합물(MnCl₂)을 24시간씩 노출시켰다. 이어서 DCFH-DA 용액을 가하여 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후 1 M NaOH를 넣어 세포를 분해시키고 일정량을 검정 96 well plate으로 옮겨 480 nm(Ex.) 및 530 nm(Em.)에서 형광도를 측정하였다. 단백질 정량은 Lowry assay로 실행하였으며, 결과는 단백질(μg)당 흡광도의 변화로 계산한 것을 대조군의 백분율로 나타내었다. 또한 ROS를 생성하는 세포의 형광이미지를 제작하기 위해 8 chamber slide에 세포를 2×10³ cells로 분주하여 24시간 동안 부착시킨 후 각 시료를 농도별로 24시간 동안 처리하였다. 계속해서 DCFH-DA를 37°C에서 30분 동안 반응시키고 PBS로 세척한 후 형광현미경으로 촬영하였다.^{13,14)}

세포내 GSH 측정

세포를 6 well plate에 1×10⁶ cells/ml 농도로 분주하여 24시간 동안 부착시키고 200, 400, 800, 1600 μM의 망간화합물(MnCl₂)을 24시간 동안 처리하였다. 트립신으로 세포를 회수한 후 PBS로 세척하고, 1% perchloric acid를 넣어 얼음 위에서 10분간 방치하였다. KH₂PO₄/EDTA로 희석한 1 mg/ml의 ortho-phthaldialdehyde를 넣어 30분간 실온에서 반응시키고 350 nm(Ex)과 420 nm(Em)에서 형광도를 측정한 후 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.^{13,14)}

단백질 정량은 제조회사의 프로토콜에 따라 BCA protein assay로 실행하였다.¹⁵⁾

Caspase-3 Activity 측정

세포를 5×10⁵ cells/ml로 분주하여 24시간 동안 부착시키고 200, 400, 800, 1600 μM의 망간화합물(MnCl₂)을 24시간 동안 처리한 후, 트립신으로 회수하여 세포용해완충액을 이용하여 용해시켰다. 이렇게 얻어진 세포용해물에 caspase-3 특이기질인 DEVD-pNA와 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후, 405 nm에서 발색정도를 측정하고 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 단백질 정량은 제조회사의 프로토콜에 따라 BCA protein assay로 실행하였다.

DNA 분절시험

세포를 1×10⁶ cells/ml로 분주하여 24시간 동안 부착시킨 후 200, 400, 800, 1600 μM의 망간화합물(MnCl₂)을 96시간 동안 처리하였다. 트립신 처리하여 회수한 세포를 PBS로 세척하고 Genomic DNA purification kit(Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 제조회사의 프로토콜에 따라 DNA를 추출하였으며, 추출된 DNA는 ethidium bromide(10 mg/ml)를 0.02% 함유하는 1.5% 아가로스 젤에 전기영동하여 분절 정도를 확인하였다.

Table I – Primer be used to investigate change of gene expression

Primer name	GB No.	Gene sequence
Heme oxygenase-1	J02722.1	F:5'-GGTCCTGAAGAAGATTGCGCA-3' R:5'-TCTGTGAGGGACTCTGGTCTT-3'
Thioredoxin reductase	AF111160.1	F:5'-GTAGATTAGCCAAGTCACCG-3' R:3'-GTCAGATGGCTTAGTAGAGC-3'
NADPH quinone oxidase	J02679.1	F:5'-GGACATGAACGTCATTCTCT-3' R:5'-TTGGAGCAAAGTAGAGTGTT-3'

DAPI 염색

8 chamber slide에 세포를 2×10^3 cells로 분주하여 24시간 동안 부착시키고 200, 400, 800, 1600 μM 의 망간화합물(MnCl_2)을 24시간 동안 처리하였다. 4% paraformaldehyde를 넣고 5분간 고정시킨 후 염색액이 잘 침투할 수 있도록 0.1% Triton X-100을 처리하고 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole) 용액으로 염색하여 세포핵의 변화를 형광현미경으로 관찰하였다.¹⁶⁾

PCR 기법을 이용한 유전자발현 분석

세포를 6 cm petridish에 분주하여 24시간 동안 부착시키고 200, 400, 800, 1600 μM 의 망간화합물(MnCl_2)을 24시간 동안 처리하였다. RNA isolation kit를 이용하여 제조회사의 프로토콜에 따라 RNA를 추출하고 UV spectrophotometer를 이용하여 추출한 RNA의 양을 정량한 후, 동량의 RNA를 이용해 RT-PCR과 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 실행하였다. PCR에 사용된 primer의 염기서열은 Table I과 같다.

통계 처리

실험 결과는 평균 \pm SD로 표현하였으며, 통계적 의미는 Student's t tests를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

망간화합물은 지각이나 물, 혹은 대기 중에 다양한 물리적, 화학적 형태로 존재하며, 체내에서 일어나는 다양한 효소적 반응의 보조인자로서 필수적인 역할을 담당한다. 그러나 고농도의 망간에 장기간 지속적으로 노출됨으로써 체내에 축적되는 망간의 양이 증가하는 경우 신경계 및 호흡기계에 손상을 야기할 수 있다.⁴⁾ 더 나아가 고농도의 망간을 함유하는 분진이나 흡에 장시간 노출되는 작업장 노출의 경우 기관지를 통해 흡수된 망간은 혈행을 타고 전신으로 이동해 다양한 장기에 영향을 미칠 수 있을 것으로 생각되며 심혈관계 또한 그 목표장기가 될 수 있다.¹²⁾ 이에 본 연구에서는 망간에 의한 심근독성이 어느 정도의 농도에서 발현되며, 어떠한 기전을 통해 독성이 일어나는지에 대해 랜드에서 유래한 심근세포주를 이용하여 세포수준에서 평가해 보고자 하였다.

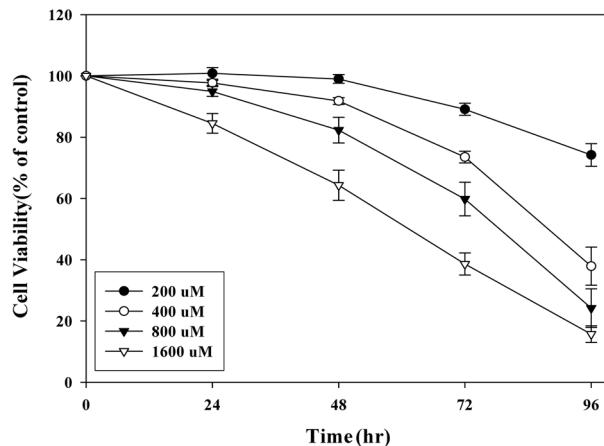


Fig. 1 – Effect of Mn on the viability of H_9C_2 cell line. Cells were treated with MnCl_2 for 24, 48, 72 and 96 hr. The indicated concentrations represent Mn^{2+} concentration calculated from MnCl_2 added to the media. Cell viability was assessed by MTT assay. Data represented as the percentage of the control group. Cell viability was greatly reduced in a dose- and time-dependent manner by Mn. Results represent the means of three separated experiments, and error bars represent the standard error of the mean. Except the treated events with 200 μM Mn for 24, 48 hr, all events indicate a statistically significant difference (** : $p < 0.01$) from the control group.

먼저, 망간이 H_9C_2 세포주에 미치는 독성을 평가하기 위하여 200, 400, 800, 1600 μM 의 망간화합물(MnCl_2)을 단계 희석하여 각각 24, 48, 72, 96시간씩 처리한 결과 Fig. 1과 같이 농도의존적인 세포독성을 관찰할 수 있었으며, 1600 μM 로 24시간 처리한 경우의 세포생존율은 약 84.5%로 감소하였고, 96시간의 세포생존율은 15.7% 정도로 낮아졌다.

Rovetta 등은¹⁷⁾ 간(HepG2, human hepatoblastoma), 신장(MDCK, Madine-Darby canine kidney cell line) 신경교(GL15, human glioblastoma), 신경(SHSY5Y, human neuroblastoma)에서 유래한 4종의 세포주에 0.1~1000 μM 의 망간화합물(MnCl_2)을 처리함으로써 망간화합물에 대한 각 조직의 IC₅₀ 값을 산출하고 이를 비교·분석하였는데, 24시간을 처리한 결과 신경세포인 SHSY5Y 세포주의 IC₅₀ 값이 500 μM 로 가장 낮았고 다른 세포주의 IC₅₀ 값은 700~800 μM 로 거의 유사하였다. 따라서

랫드의 심근세포에서 유래한 H_9C_2 세포주인 경우는 이들 세포주에 비해 덜 민감한 것으로 판단된다.

호흡을 통해 인체에 유입된 대기 중 유해물질은 일반적으로 체내에 반응 산소종(Reactive oxygen species)을 발생시킴으로

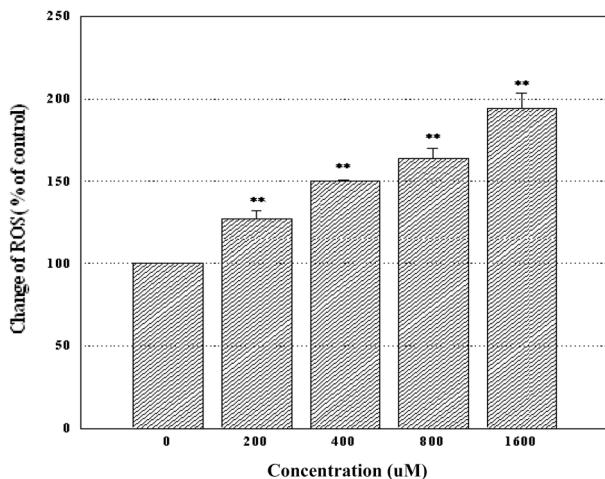


Fig. 2 – Effect of Mn on ROS production in H_9C_2 cell line. Cells grown in confluent were pre-treated with $MnCl_2$, washed with phosphate buffered saline, and then incubated with DCFH-DA 40 mM. At the end of DCFH-DA incubation, the cells were lysed with NaOH and fluorescence of aliquot was measured. Results represent the means of three independent experiments, and error bars represent the standard error of the mean. All group indicate a statistically significant difference (** : $p < 0.01$) from the control group.

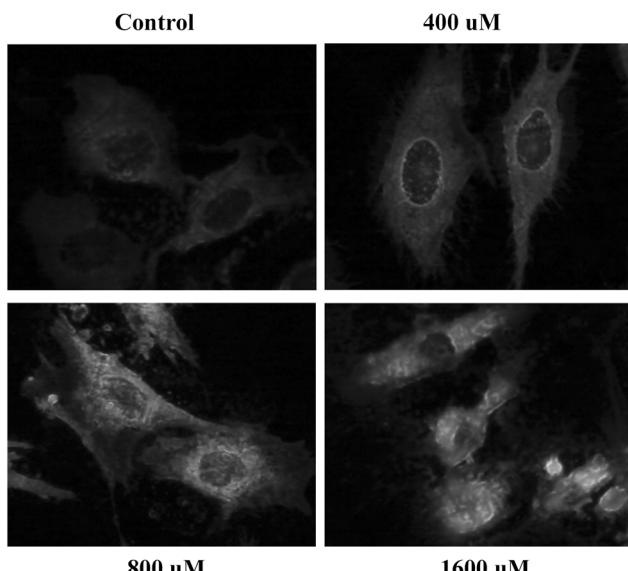


Fig. 3 – Qualitative characterization of ROS generation by DCFH-DA staining using fluorescence microscopy. Cells grown in confluent were pre-treated with $MnCl_2$, and then loaded with 40 mM DCFH-DA. After washing with PBS, cells were visualized by fluorescent microscopy ($\times 200$).

써 인체에 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 그리하여 심근세포에서 나타난 세포독성과 반응산소종의 발생과의 상관관계를 살펴보자. 200, 400, 800, 1600 μM 의 망간화합물을 24시간씩 처리한 후 기질인 DCFH-DA를 이용하여 형광강도의 변화를 측정해 본 결과 Fig. 2와 3에서 보는 바와 같이 형광강도가 농도의존적으로 증가하였으며, 1600 μM 로 처리한 경우 대조군에 비해 약 2배 정도 증가하는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 동일한 세포주에 비소화합물(As_2O_3)을 처리한 경우 약 98% 정도의 세포생존율을 나타낸 0.5 ppm의 농도에서 ROS가 약 2배 정도 증가하였고,¹⁸⁾ 사람의 자궁 경부암 세포주(uterine cervical carcinoma)에서 유래한 Hela 세포에 1 mM의 망간화합물을 처리한 경우 ROS의 발생이 약 6.5배 정도 증가하였다¹⁹⁾는 기존의 연구결과와 비교한다면 ROS의 발생 또한 상태적으로 낮은 것으로 평가되었다.

일반적으로 세포내 반응산소종의 증기는 세포내에서 항산화물질로 작용하는 환원형 글루타チ온의 감소를 동반하는 것으로 알려져 있다. 200, 400, 800, 1600 μM 의 망간화합물을 24시간씩 처리한 후 얻어진 세포용해물과 형광기질인 *ortho*-phthaldialdehyde를 반응시킨 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 세포내 환원형 글루타チ온 함량이 200 μM 부터 농도 의존적으로 감소하였으며, 1600 μM 로 24시간 처리한 경우에는 대조군의 61% 정도로 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한, 망간화합물이 랫드의 심근세포주에 야기하는 일련의 산화적 스트레스 과정은 heme oxygenase-1, thioredoxin reductase, NADPH quinone oxidase

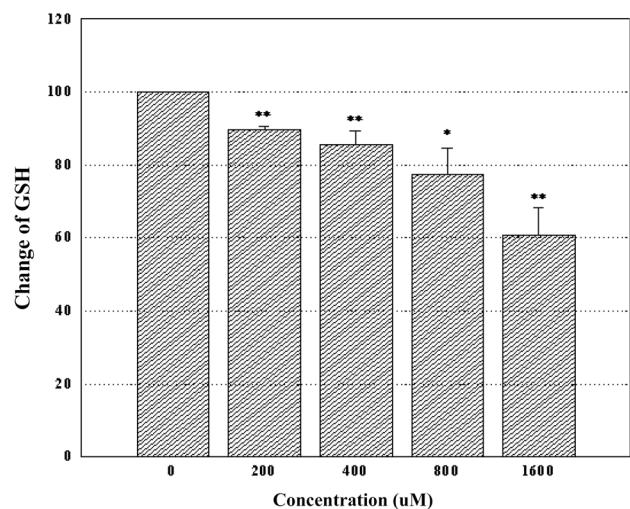


Fig. 4 – Effect of Mn on the level of intracellular reduced glutathione (GSH). Fluorometric method using *o*-phthaldialdehyde was used to measure the intracellular GSH. Results represent the means of three independent analysis. GSH was calculated as nmol of glutathione per mg of protein and then was represented as the percentage of the control group. Asterisks indicate a statistically significant difference (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$) from the control group.

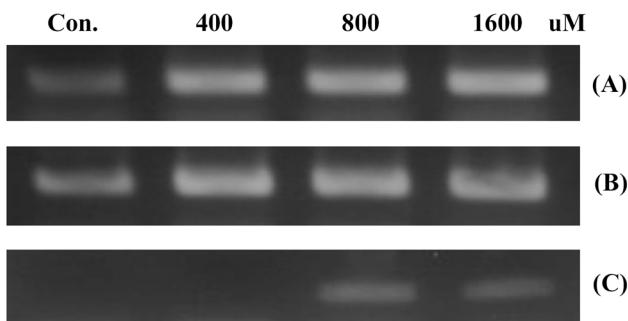


Fig. 5 – Effect of Mn on the induction of oxidative stress-related genes. Cells were treated with the indicated concentrations of Mn for 24 hr. mRNA transcription was detected by RT-PCR analysis using respective primers described in Table I. (A): heme oxygenase-1, (B): thioredoxin reductase, (C): NADPH quinone oxidase.

등 기존의 연구자료를 통해 산화적 스트레스와 깊은 상관성이 있는 것으로 알려진 여러 유전자의 발현을 뚜렷하게 증가시키는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5).

Milatovic 등은 세포수준에서 망간의 독성을 관찰한 경우, 세포내에 흡수된 망간은 미토콘드리아에 선택적으로 축적되어 미토콘드리아의 주요기능인 산화적 인산화를 억제시키고 활성산소 종의 발생을 증가시켰다고 보고하였으며,¹⁾ Crossgrove 등은 고농도의 망간이 Ca^{++} 채널을 차단한다고 보고하였다.²⁰⁾ 본 연구

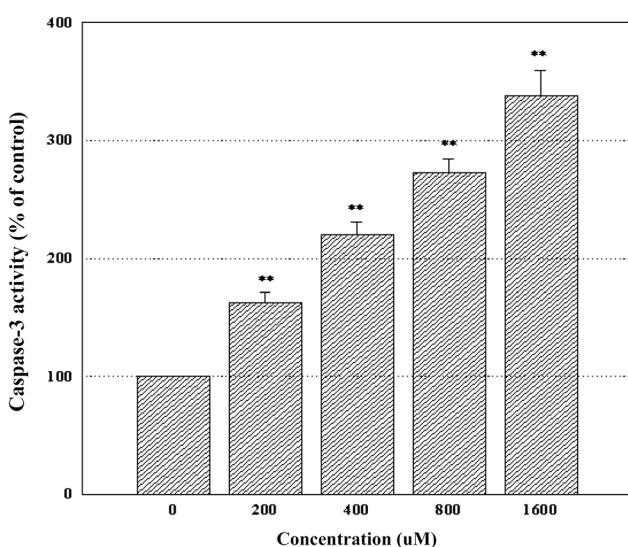


Fig. 6 – Effect of Mn on the caspase-3 activity. Cells were treated with the indicated concentrations of Mn for 24 hr. Caspase-3 activity was measured using a colorimetric caspase-3 specific substrate. After the reaction, the chromophore pNA was determined at 405 nm. Results represent the means of four separated experiments, and error bars represent the standard error of the mean. All group indicate a statistically significant difference ($p < 0.01$) from the control group.

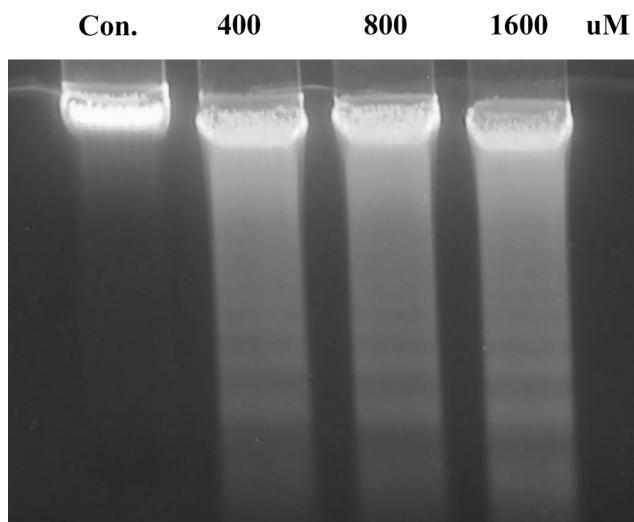


Fig. 7 – DNA fragmentation by Mn on agarose gel electrophoresis. Cells were treated with the indicated concentrations of Mn for 24 hr. DNA laddering was performed using genomic DNA extractions which were prepared from control and Mn-treated cells. DNA fragmentation was shown by electrophoresis using 1.5% agarose gel.

에서 망간에 의한 ROS의 발생이 비교적 낮게 측정된 것은 아마도 망간에 의한 세포독성이 또 다른 경로를 통해 유도될 수 있기 때문인 것으로 추정된다.

아울러 본 연구에서는 망간화합물에 의한 세포독성[apoptosis

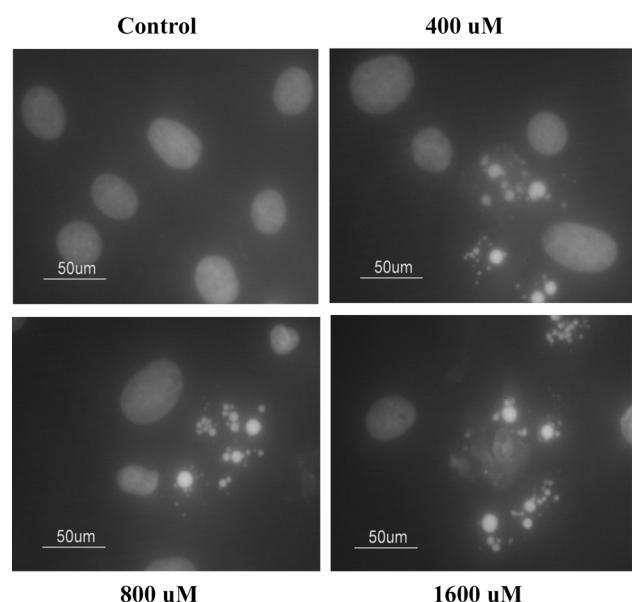


Fig. 8 – Increase of chromosome condensation by Mn with DAPI staining. Cells were treated with the indicated concentrations of Mn for 24 hr. DAPI solution was applied to the cultured cells in 8 chamber slides, and the slides were incubated for 10 min in the dark at 37°C and the images of nuclei were made by fluorescent microscope.

에 의해 야기되는지 혹은 necrosis에 의해 야기되는지를 확인하기 위하여 caspase cascade의 최종단계에 해당하는 caspase-3 활성의 증가와 DNA 분절, 핵 내 크로마틴의 응축 여부를 관찰해 보았다. 200, 400, 800, 1600 μM 의 망간화합물을 각각 24시간씩 처리한 후 얻어진 세포용해물에 기질인 DEVD-pNA를 반응시킨 후 발색정도를 비교한 결과 Fig. 6에서 보는 바와 같이 caspase-3의 활성이 농도 의존적으로 증가하였으며 1600 μM 로 처리한 경우 대조군에 비해 3.4배 정도 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한, 400, 800, 1600 μM 의 망간화합물을 각각 24시간씩 처리한 후 추출한 DNA를 이용하여 DNA 분절여부를 관찰한 결과 DNA 분절정도가 농도 의존적으로 증가하였으며(Fig. 7), 400, 800, 1600 μM 의 망간화합물을 24시간씩 처리한 세포의 핵 내에서 breakage와 크로마틴 응축이 뚜렷하게 관찰되었다(Fig. 8). 이러한 현상은 망간화합물을 PC12 세포주에 처리한 Hirata의 연구결과와 Hela 세포에 처리한 Oubrahim의 연구결과에서도 확인 할 수 있었다.^{19,21)}

결 론

산업장 등에서 고농도의 망간화합물을 함유하는 분진이나 흡이 호흡을 통해 근로자들의 체내에 유입되는 경우, 어느 정도의 농도에서 심장기능이 손상될 수 있는지를 세포수준에서 관찰해 보고자 랜드의 심근세포에서 유래한 H_9C_2 세포주를 이용하여 연구한 결과 200 μM 로 24시간 처리한 경우 독성이 관찰되기 시작 하였으며, 이러한 세포독성은 세포내 ROS의 증가와 환원형 글루타치온의 감소를 동반하는 산화적 스트레스 기전에 의하여 일 어났다. 이러한 결과는 망간의 비정상적 축적이 심부전, 심근경색 등 심질환의 위험인자로 작용할 수 있음을 암시하는 것이라고 생각된다.

참고문헌

- 1) Milatovic, D., Yin, Z., Gupta, R. C., Sidoryk, M., Albrecht, J., Aschner, J. L. and Aschner, M. : Manganese induces oxidative impairment in cultured rat astrocytes. *Toxicol. Sci.* **98**, 198 (2007).
- 2) Liao, S. L., Ou, Y. C., Chen, S. Y., Chiang, A. N. and Chen, C. J. : Induction of cyclooxygenase-2 expression by manganese in cultured astrocytes. *Neurochem. International.* **50**, 905 (2007).
- 3) Aschner, M., Guilarte, T. R., Schneider, J. S. and Zheng, W. : Manganese : Recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **221**, 131 (2007).
- 4) <http://toxnet.nlm.nih.gov>, Manganese compounds, Environmental fate & Exposure.
- 5) Bowler, R. M., Roels, H. A., Nakagawa, S., Drezgic, M., Diamond, E., Park, R., Koller, W., Bowler, R. P., Mergler, D., Bouchard, M., Smith, D., Gwiazda, R. and Doty, R. L. : Dose-effect relationships between manganese exposure and neurologic neuropsychological and pulmonary function in confined space bridge welders. *Occup. Environ. Med.* **64**, 167 (2007).
- 6) Roels, H., Lauwerys, R., Buchet, J. P., Genet, P., Sarhan, M. J., Hanotiau, I., de Fays, M., Bernard, A. and Stanescu, D. : Epidemiological survey among workers exposed to manganese : effects on lung, central nervous system, and some biological indices. *J. Ind. Med.* **11**, 307 (1987).
- 7) Roels, H. A., Ghyselen, P., Buchet, J. P., Ceulemans, E. and Lauwerys, R. R. : Assessment of the permissible exposure level to manganese in workers exposed to manganese dioxide dust. *J. Ind. Med.* **49**, 25 (1992).
- 8) Lucchini, R., Apostoli, P., Perrone, C., Placidi, D., Albini, E., Migliorati, P., Mergler, D., Sassine, M. P., Palmi, S. and Alo, L. : Long-term exposure to "low levels" of manganese oxides and neurofunctional changes in ferroalloy workers. *Neurotoxicology* **20**, 287 (1999).
- 9) Lucchini, R., Selis, L., Folli, D., Apostoli, P., Mutti, A., Vanoni, O., Iregren, A. and Alessio, L. : Neurobehavioral effects of manganese in workers from a ferroalloy plant after temporary cessation of exposure. *Scand. J. Work. Environ. Health* **21**, 143 (1995).
- 10) Myers, J. E., Thompson, M. L., Ramushu, S., Young, T., Jeethay, M. F., London, L., Esswein, E., Renton, K., Spies, A., Boulle, A., Naik, I., Iregren, A. and Rees, D. J. : The nervous system effects of occupational exposure on workers in a south african manganese smelter. *Neuro. Toxicol.* **24**, 885 (2003).
- 11) Elbetieha, A., Bataineh, H., Darmani, H. and Al-Hamood, M. H. : Effects of long-term exposure to manganese chloride on fertility of male and female mice. *Toxicol. Lett.* **119**, 193 (2001).
- 12) Crossgrove, J. and Zheng, W. : Manganese toxicity upon overexposure. *NMR Biomed.* **17**, 544 (2004).
- 13) Elbekai, R. H. and El-Kadi, A. O. S. : The role of oxidative stress in the modulation of aryl hydrocarbon receptor-regulated genes by As^{3+} , Cd^{2+} and Cr^{6+} . *Free Radical Biol. Med.* **39**, 1499 (2005).
- 14) Fotakis, G., Cemeli, E., Anderson, D. and Timbrell, J. A. : Cadmium chloride-induced DNA and lysosomal damage in a hepatoma cell line. *Toxicol. In Vitro.* **19**, 481 (2005).
- 15) Brenner, A. J. and Harris, E. D. : A quantitative test for copper using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **226**, 80 (1995).
- 16) Dhar-Mascarenho, M., Carcamo, J. M. and Golde, D. W. : Hypoxia-reoxygenation induced mitochondrial damage and apoptosis in human endothelial cells are inhibited by vitamin

- C. *Free Radic Biol Med.* **38**, 1311 (2005).
- 17) Rovetta, F., Catalani, S., Steinberg, N., Boniotti, J., Gilberti, M. E., Mariggio, M. A. and Mazzoleni, G. : Organ-specific manganese toxicity : a comparative *in vitro* study on five cellular models exposed to MnCl₂. *Toxicol. In Vitro.* **21**, 284 (2007).
- 18) Park, E. J. and Park, K. S. : Gene expression profiles of cultured rat cardiomyocytes (H9C2 cells) in response to arsenic trioxide at subcytotoxic level and oxidative stress. *J. Health Sci.* **52**, 512 (2006).
- 19) Oubrahim, H., Stadtman, E. R. and Chock, P. B. : Mitochondria play no roles in Mn(II)-induced apoptosis in HeLa cells. *PNAS* **98**, 9505 (2001).
- 20) Crossgrove, J. S. and Yokel, R. A. : Manganese distribution across the blood-brain barrier IV. Evidence for brain influx through store-operated calcium channels. *Neurotoxicology* **26**, 297 (2005).
- 21) Yoko, H. : Manganese-induced apoptosis in PC12 cells. *Neurotoxicol. Teratol.* **24**, 639 (2002).