



แคดเมียมปริมาณต่ำกระตุ้นการแสดงออกของฮีนเมทัลโลไธโอนีน และฮีมออกซีจีเนส-1 ในเซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์รกชนิดเจอีจี-3 ของมนุษย์

วาจาทิพย์ บุณยวิชิต, ธนกร เกิดอินทร์, อีรพงศ์ ชัยมี และธารทิพย์ บุญส่ง*

Low-level Cadmium Exposure Induces Metallothionein and Heme Oxygenase-1 gene Expression in Human Choriocarcinoma Cell Line JEG-3

Wajathip Bulanawichit, Thanagon Kirdin, Theerapong Chaimee and Tantip Boonsong*

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok Province.

* Corresponding author. Email address: tantips@hotmail.com

บทคัดย่อ

แคดเมียมเป็นโลหะหนักที่มีความเป็นพิษ พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะในเมืองใหญ่ที่มีมลภาวะทางอากาศ และแหล่งที่สำคัญแหล่งหนึ่งของแคดเมียมในสิ่งแวดล้อมมาจากควันบุหรี่ แคดเมียมทำให้เกิดความเป็นพิษต่อตับ ไต และระบบไหลเวียนโลหิต รวมทั้งอวัยวะสืบพันธุ์ ได้แก่ รก อัณฑะ และรังไข่ของมนุษย์ การได้รับแคดเมียมในหญิงตั้งครรภ์อาจส่งผลร้ายต่อการเจริญเติบโตของทารกในครรภ์ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการทดสอบผลของแคดเมียมต่อเซลล์รก โดยเลือกเซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์รกของมนุษย์ชนิด JEG-3 choriocarcinoma เป็นโมเดลสำหรับการศึกษา โดยเซลล์จะถูกนำมาทดสอบด้วยสารแคดเมียม (CdCl_2) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจวัดผลด้านความเป็นพิษของแคดเมียมต่ออัตราการอยู่รอดของเซลล์ ด้วยเทคนิค 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) วิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมที่ได้รับเข้าสู่เซลล์ โดยเทคนิค inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) และผลของแคดเมียมต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของฮีนเมทัลโลไธโอนีน (MT) และฮีมออกซีจีเนส-1 (HO-1) โดยวิธี reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) จากการศึกษาพบว่าอัตราการอยู่รอดของเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมที่ความเข้มข้น 0.049 ไมโครโมลาร์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่เซลล์ที่ได้รับแคดเมียมที่ความเข้มข้น 0.159, 0.78, 3.125, 6.25 และ 12.5 ไมโครโมลาร์ มีอัตราการอยู่รอดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และความเข้มข้นของแคดเมียมที่สามารถยับยั้งอัตราการอยู่รอดของเซลล์ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 0.878 ไมโครโมลาร์ หลังจากเซลล์ได้รับแคดเมียมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการวัดปริมาณแคดเมียมภายในเซลล์ พบว่าปริมาณแคดเมียมภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้นสัมพันธ์กับความเข้มข้นของแคดเมียมที่เซลล์ได้รับ นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อเซลล์ได้รับแคดเมียมในปริมาณต่ำจะเกิดการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของฮีน MT และ HO-1 เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าแคดเมียมมีผลทำให้เกิดการตายของเซลล์ JEG-3 และการกระตุ้นการแสดงออกของฮีน MT และ HO-1 ซึ่งอาจเป็นกลไกการตอบสนองเพื่อการปกป้องเซลล์จากพิษของแคดเมียม

คำสำคัญ: แคดเมียม เซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์รกชนิดเจอีจี-3 เมทัลโลไธโอนีน ฮีมออกซีจีเนส-1

Abstract

Cadmium (Cd) is a toxic heavy metal that is widely distributed in the air polluted city areas, and one of its important sources in the environment is from cigarette smoking. Cd is toxic to various human organs such as liver, kidney, blood circulation, and to reproductive systems such as placentas, testes, and ovaries. Cd exposure during pregnancy may affect fetal growth and development. In this study, we aimed to examine the effect of Cd on placental cells, using JEG-3 cell, a human choriocarcinoma cell line, as a model of study. Cells were treated with various concentrations of CdCl_2 for 24 hours, before the cells viability was measured by 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay, cellular Cd accumulation by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) technique, and changes in metallothionein (MT) and heme oxygenase-1 (HO-1) gene expression by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The results showed that



cell viability of JEG-3 cells treated with Cd at a concentration of 0.049 μM was not statistically significant compared to control; whereas, at concentrations of 0.159, 0.78, 3.125, 6.25, and 12.5 μM significantly decreased cell viability ($p < 0.05$) was observed compared to control. The Cd concentration required for 50% inhibition of cell viability (IC_{50}) of JEG-3 cells was 0.878 μM after 24 hours incubation. In Cd-treated cells, the increase in cellular Cd accumulation was concentration-dependent. In addition, the expression of MT and HO-1 after low level Cd exposure were found to significantly increase ($p < 0.05$). These results strongly suggest that Cd exposure causes Cd-induced lethality and induction of MT and HO-1 expression which may be responsive effects to protect cells against Cd toxicity.

Keywords: cadmium, choriocarcinoma cell line JEG-3, metallothionein, heme oxygenase-1

บทนำ

แคดเมียมเป็นโลหะหนักพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม และจากอุตสาหกรรมหลายประเภทได้แก่ การทำเหมืองแร่สังกะสี และตะกั่ว (Muntau, & Baudo, 1992) การผลิตพีวีซี เม็ดสี แบตเตอรี่ และปุ๋ยฟอสเฟต (Jarup, Berglund, Elinder, & Vahter, 1998) แคดเมียมเข้าสู่ร่างกายได้ทั้งทางการกิน การหายใจ และทางผิวหนัง อัตราการดูดซึมขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิต อายุ การตั้งครรภ์ และภาวะโภชนาการ (Reproductive and Cancer Hazard Assessment Section (RCHAS), 1996) และการได้รับควันทะกั่วหรืออาจทำให้ได้รับแคดเมียมในปริมาณสูงได้ถึงครึ่งหนึ่งของแคดเมียมที่ได้รับทั้งหมด (Satarug, & Moore, 2004) ทั้งนี้องค์การอนามัยโลก องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO/WHO, 1989 and 1993) ได้กำหนดปริมาณแคดเมียมที่มนุษย์ได้รับไม่ควรเกินสัปดาห์ละ 7 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม

ค่าครึ่งชีวิต (half-life) ของแคดเมียมในร่างกายมนุษย์มีเวลานานถึง 30 ปี จึงทำให้การสะสมแคดเมียมในร่างกายมากขึ้นตามอายุ พิษของแคดเมียมทำให้เกิดผลเสียต่อเซลล์และอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย ได้แก่ กระดูก (Godt, et al., 2006) ตับ (Jarup, et al., 1998; Harstad, & Klaassen, 2002) ไต (Barbier, Jacquillet, Tauc, Cougnon, & Poujeol, 2005) ปอด หลอดเลือดหัวใจ และระบบสืบพันธุ์ (Fowler, 2009) นอกจากนี้ยังมีผลต่อการสร้างสเปิร์ม (Leoni, et al., 2002) การฝังตัวของตัวอ่อน (Yu, Tam, & Chan, 1985) ทำให้เกิดการอักเสบ (Kataranovski, et al., 2009) และการเกิดอนุมูลอิสระ (reactive oxygen

species; ROS) (Chen, Liu, & Huang, 2008) การสะสมของแคดเมียมในรกอาจมีผลทำให้การทำงานของรกผิดปกติ ส่งผลต่อการขนส่งสารอาหารหรือแร่ธาตุที่จำเป็นไปยังทารก และอาจมีผลต่อการพัฒนาและการเจริญเติบโตของทารกได้ (Ronco, et al., 2009) จากรายงานการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าการได้รับแคดเมียม 50–100 ppm ขณะตั้งท้อง สามารถรบกวนหน้าที่การทำงานของรกที่ทำให้การขนส่งธาตุเหล็กและสังกะสี (Sorell, & Graziano, 1990) รวมทั้งการขนส่งแคลเซียมไปยังตัวอ่อนลดลง (Stulc, Stulcova, & Svihovec, 1990) ซึ่งส่งผลต่อการขาดธาตุที่จำเป็นเหล่านี้ และมีผลต่อการพิการตั้งแต่กำเนิดของตัวอ่อนได้ (Hanlon, Fern, & Mc Lain, 1989) นอกจากนี้ยังพบการเกิดภาวะโลหิตจางของตัวอ่อน (Sorell, & Graziano, 1990) ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งของการเจริญเติบโตของตัวอ่อนขณะตั้งท้องที่ช้าลงด้วย (Webster, 1978) จากผลการศึกษาทั้งในหนู rat (Ronco, et al., 2009) และในมนุษย์ (Llanos, & Ronco, 2009) แสดงให้เห็นว่าการลดลงของน้ำหนักของลูกหนู rat (Ronco, et al., 2009) และ ทารกแรกเกิด (Llanos, & Ronco, 2009) มีความสัมพันธ์กับระดับแคดเมียมที่สะสมในรก แคดเมียมยังส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีนต่างๆ ภายในเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมด้วย เช่น การกระตุ้นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการปกป้องเซลล์จากพิษของแคดเมียม และกระบวนการตายของเซลล์ ได้แก่ metallothionein (MT), heat shock protein (Hsp) 70 และ heme oxygenase (HO) -1 เป็นต้น (Kusakabe, et al., 2008) โปรตีน MT เป็นโปรตีนที่ช่วยปกป้องเซลล์จากพิษของแคดเมียม โดยเมื่อแคดเมียมถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายแล้วจะกระจายตัวไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกาย

ผ่านทางกระแสเลือด แคดเมียมในร่างกายที่อยู่ในรูปของไอออน (Cd^{2+}) สามารถจับกับกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) ในโมเลกุลของโปรตีน MT และเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ($Cd-MT$) (Klaassen, Liu, & Choudhuri, 1999) ทำให้ลดความเป็นพิษของแคดเมียมต่อเซลล์และอวัยวะต่างๆ ของร่างกายได้ (Kondo, Woo, Michalska, Choo, & Lazo, 1995) ในเซลล์รกของมนุษย์พบว่ามีการแสดงออกของยีน MT (Goyer, Haust, & Cherian 1992) และเมื่อเซลล์ได้รับแคดเมียมจะกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีน MT มากขึ้นเพื่อลดความเป็นพิษต่อเซลล์รกและป้องกันไม่ให้แคดเมียมผ่านจากแม่ไปยังทารกในครรภ์ (Kippler, Hoque, Raqib, Öhrvik, Ekström, & Vahter, 2010) จากการศึกษาพบว่าแคดเมียมทำให้มีระดับของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นซึ่งส่งผลให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) (Thévenod, 2009) ชักนําให้เกิดกระบวนการ lipid peroxidation ของไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการออกซิไดซ์ชีวโมเลกุล เช่น โปรตีน และดีเอ็นเอ ส่งผลทำให้เซลล์ถูกทำลาย (Dally, & Hartwig, 1997) การวัดการสร้างโปรตีน HO-1 ถูกนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพ (biomarker) ของการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Ossola, & Tomaro, 1995) HO-1 มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ภายในเซลล์ (Stocker, 2004; Takeda, Ishizawa, Sato, Yoshida, & Shibahara, 1994) มีรายงานการศึกษาพบว่าแคดเมียมกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีน HO-1 ในเซลล์ไต (Tokumoto, Lee, Fujiwara, & Satoh, 2013) และเซลล์ปอด (Kitajima, Hirano, & Suzuki, 1999) ของหนู อย่างไรก็ตามการศึกษาผลของแคดเมียมต่อโปรตีน HO-1 ในเซลล์ระบบสืบพันธุ์ยังมีน้อย ผลการศึกษาโดย Kusakabe, et al. (2008) พบว่าเมื่อเซลล์เซอร์โทไล (sertoli cell) ซึ่งเป็นเซลล์ช่วยในการยืดเกาะของเซลล์สืบพันธุ์ของหนูเพศผู้ได้รับแคดเมียมเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จะกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีน HO-1 เพิ่มมากขึ้น

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาผลของแคดเมียมที่มีต่อการอยู่รอดของเซลล์ การสะสมของแคดเมียมภายในเซลล์ และการแสดงออกของยีน MT และ HO-1 ในเซลล์ โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์รกชนิด

JEG-3 (JEG-3 choriocarcinoma cells) ของคนเป็นโมเดลในการศึกษา เซลล์ชนิดนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) แบบเซลล์โทรโฟบลาสท์ ชนิดซินไซโตโทรโฟบลาสท์ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการแลกเปลี่ยนสารอาหารต่างๆ ระหว่างแม่และทารกในครรภ์ ความเข้าใจกลไกการป้องกันการทำลายของเซลล์รกจากพิษของแคดเมียม อาจนำไปใช้ประโยชน์เพื่อเป็นแนวทางในการป้องกัน และ/หรือส่งเสริมคุณภาพชีวิตโดยเฉพาะกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ที่อาจมีความเสี่ยงต่อการได้รับสารพิษแคดเมียมโดยทั้งทางตรงและทางอ้อม

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. งานวิจัยนี้ใช้เซลล์รกชนิด JEG-3 choriocarcinoma ของคน (human choriocarcinoma cell line JEG-3) จากบริษัท ATCC (HTB-36, Rockville, USA) อาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ JEG-3 คือ Minimum Essential Medium Eagle (MEM) (Biochrome AG, Berlin) ที่เติม L-glutamine [2 mM], fetal bovine serum (FBS) [10%] (Biochrome AG, Berlin), ยาปฏิชีวนะ penicillin G [100 U/ml] และ streptomycin-sulfate [100 μ g/ml] (Biochrome AG, Berlin) โดยเฉพาะเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์พลาสติกขนาด 75 ตารางเซนติเมตร (SPL, Korea) และบ่มในตู้เพาะเลี้ยง (Faster BHA72, Holten) ที่ควบคุมความชื้น ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะ 5% CO_2

2. การทดสอบความเป็นพิษของแคดเมียมต่อการอยู่รอดของเซลล์ (cell viability) JEG-3 ด้วยวิธี 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้น 1.3×10^4 cells/ml ใน 96-well plate (Corning, USA) แล้วบ่มในตู้เพาะเลี้ยงที่ควบคุมความชื้น ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะ 5% CO_2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายแคดเมียมที่เตรียมให้มีความเข้มข้นก่อนเจือจาง ($CdCl_2$ stock solution) ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์) มาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์จนได้ความเข้มข้นสุดท้าย คือ 0.049, 0.159, 0.78, 3.125, 6.25 และ 12.5 ไมโครโมลาร์ จำนวน 100 ไมโครลิตร



ต่อหลุม (well) โดยมีเซลล์ที่เติมเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นกลุ่มควบคุม นำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์อีกครั้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดทิ้งแล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่ไม่มี FBS จำนวน 100 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 20 ไมโครลิตรลงไปในแต่ละหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ดูดสารละลายทั้งหมดทิ้งและเติมสารละลาย dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma) จำนวน 150 ไมโครลิตร ลงไปในทุกหลุมผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ELISA plate reader (Labsystems, Finland) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (A_{540}) และคำนวณเปอร์เซ็นต์อัตราการอยู่รอดของเซลล์ (% cell viability) ได้จากสูตร

$$\% \text{cell viability} = \frac{A_{540} (\text{เซลล์ที่ได้รับแคดเมียม})}{A_{540} (\text{เซลล์กลุ่มควบคุม})} \times 100$$

คำนวณหาค่าความเข้มข้นของแคดเมียมที่สามารถยับยั้งอัตราการอยู่รอดของเซลล์ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) หลังจากเซลล์ได้รับแคดเมียมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยโปรแกรม GraphPad (Prism, USA)

3. การวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมภายในเซลล์ JEG-3 ด้วยเทคนิค inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) เพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้น 7.0×10^5 cells/ml ในขวดเลี้ยงเซลล์พลาสติกขนาด 25 ตารางเซนติเมตร (SPL, Korea) แล้วบ่มในตู้เพาะเลี้ยงที่ควบคุมความชื้น ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะ 5% CO_2 เป็นเวลา 48-60 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายแคดเมียมความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมในอาหารเลี้ยงเซลล์ คือ 3.125, 12.5, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ จำนวน 5 มิลลิลิตร โดยมีเซลล์ที่เติมเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นกลุ่มควบคุม นำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์อีกครั้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูด (scrap) เซลล์ให้หลุดออกจากพื้นผิวภาชนะ และนำสารละลายเซลล์ทั้งหมดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 g (Thermo Scientific Heraeus Labofuge 400R, USA) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้าง

ตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย phosphate buffered saline (PBS) จำนวน 2 ครั้ง เติมสารละลาย 20% กรดไนตริก จำนวน 5 มิลลิลิตร เพื่อย่อยเซลล์ และส่งวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมภายในเซลล์ด้วยเทคนิค ICP-MS ณ บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด จังหวัดเชียงใหม่

4. การวัดการแสดงออกของยีน *MT* และ *HO-1* โดยเทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) เพาะเลี้ยงเซลล์ความเข้มข้น 5.0×10^5 cells/ml ใน 6-well plate (SPL, Korea) แล้วบ่มในตู้เพาะเลี้ยงที่ควบคุมความชื้น ณ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะ 5% CO_2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายแคดเมียมความเข้มข้นต่างๆ ที่เตรียมในอาหารเลี้ยงเซลล์ คือ 0.049, 0.159, 0.3 และ 0.78 ไมโครโมลาร์ จำนวน 2 มิลลิลิตร โดยมีเซลล์ที่เติมเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นกลุ่มควบคุม นำไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์อีกครั้งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ตามระยะเวลาที่ใช้ทดสอบในข้อ 2 และ 3) จากนั้นนำเซลล์ที่ได้จากการทดสอบมาสกัด total RNA ตามวิธีที่แนบมากับชุดน้ำยาของ TRI reagent (Molecular Research Center, USA) วัดปริมาณของ total RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่อง NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) นำ total RNA ปริมาณ 500 นาโนกรัม มาสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) ด้วยวิธีการสังเคราะห์ของ ReverTra Ace- α -[®] (TOYOBO, Japan) คือ บ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และ ที่อุณหภูมิ 99 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตามลำดับ cDNA ที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการทดสอบด้วยวิธี PCR ต่อไป

สำหรับ primers ของยีนเป้าหมายที่ต้องการทดสอบ คือ *MT* และ *HO-1* รวมทั้งยีนมาตรฐานที่เป็น house-keeping gene; *18S rRNA* มีลำดับเบส ดังนี้

MTF; 5'GCACCTCCTGCAAGAAAAGCT3',
MTR; 5'GCAGCCTTGGGCACACTT3' (68bp),
HO-1F; 5'CAGGCAGAGAATGCTGAG3',
HO-1R; 5'GCTTCACATAGCGCTGCA3' (271bp) (Yoshida, et al., 1988), *18S rRNAF*;

5'CGGAAGTGGAGCCATGATTA3', และ 18S rRNA; 5'TGGTCGGAAGTACGACGGTA3' (181bp)

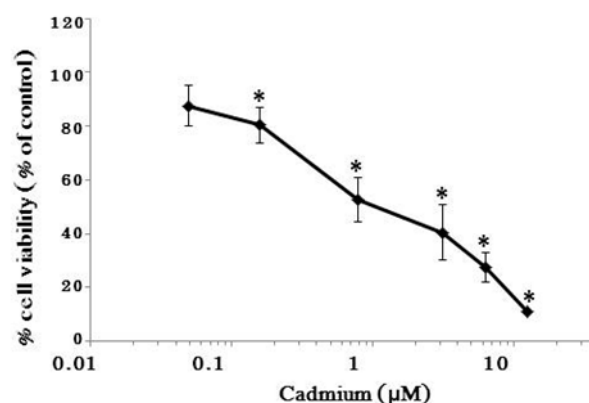
ปฏิกิริยา PCR ดำเนินการตามวิธีที่แนบมากับชุดน้ำยาของ RBC (RBC Bioscience, Taiwan) ขั้นตอนปฏิกิริยา PCR ในเครื่อง PCR (GeneAmp® PCR system9700, USA) คือ 95 องศาเซลเซียส 2 นาที จากนั้น 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 58 องศาเซลเซียส 60 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที จำนวน 30 รอบและ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที ตรวจวัดแถบ DNA บน 2.0% agarose gel (Biobasic, Canada) ที่ผสมสีฟลูออเรสเซนต์ (iNtRON Biotechnology, Korea) เพื่อแยกแถบ DNA จากนั้นประเมินและวิเคราะห์ความเข้มของแถบ DNA ด้วยวิธีการ densitometry analysis โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ภาพถ่าย imageJ (National Institutes of Health) และใช้ 18SrRNA ในการ normalize การแสดงออกของยีนเป้าหมาย

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย $\pm$ SD ระหว่างกลุ่มทดสอบ (เซลล์ที่ได้รับแคดเมียม) และกลุ่มควบคุม (เซลล์ที่ไม่ได้รับแคดเมียม) คำนวณโดยใช้โปรแกรม SPSS (U.S.A.) ซึ่งวิเคราะห์ด้วย การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (analysis of variance; One-Way ANOVA, LSD method) และกำหนดค่า $p < 0.05$ เป็นค่านัยสำคัญทางสถิติ

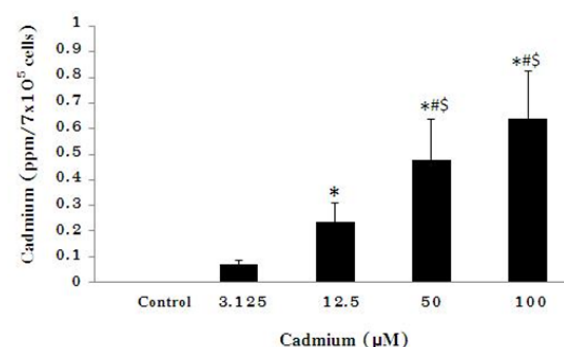
ผลการศึกษา

จากการศึกษาพบว่า การอยู่รอดของเซลล์เมื่อได้รับแคดเมียมความเข้มข้น 0.159, 0.78, 3.125, 6.25 และ 12.5 ไมโครโมลาร์ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 1) และความเข้มข้นของแคดเมียมที่สามารถยับยั้งอัตราการอยู่รอดของเซลล์ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) เท่ากับ 0.878 ไมโครโมลาร์ หลังจากเซลล์ได้รับแคดเมียมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากผลการวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมในเซลล์ JEG-3 ด้วยเทคนิค IC-PMS แสดงให้เห็นว่าเซลล์ JEG-3 รับแคดเมียมเข้าสู่เซลล์ได้เพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของแคดเมียมที่ได้รับ (concentration-dependent

manner) โดยเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่มีแคดเมียมความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ จะมีปริมาณแคดเมียมในเซลล์เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแคดเมียมความเข้มข้น 3.125 และ 12.5 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ (รูปที่ 2)



รูปที่ 1 ความมีชีวิตรอด (% cell viability) ของเซลล์ JEG-3 เมื่อได้รับแคดเมียมความเข้มข้นต่างๆ (0.049, 0.159, 0.78, 3.125, 6.25 และ 12.5 ไมโครโมลาร์) (* แสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (control)) (ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SD ของชุดข้อมูล 2 ชุด)

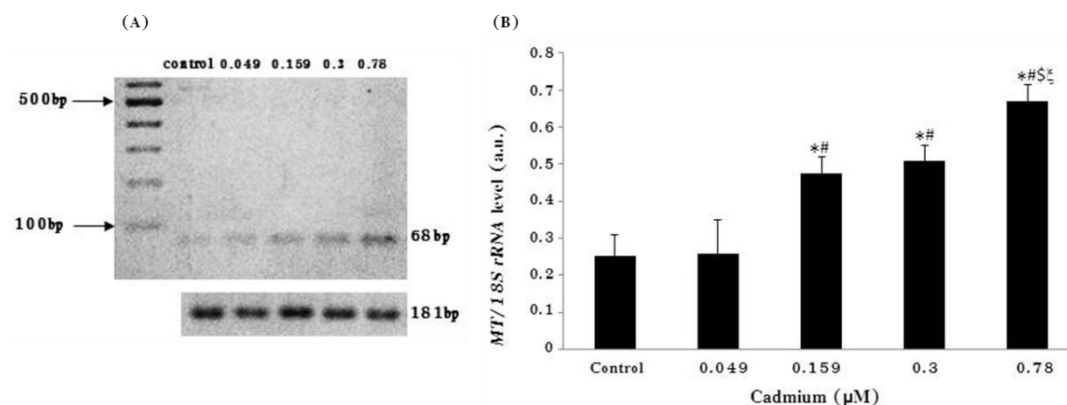


รูปที่ 2 ปริมาณแคดเมียมภายในเซลล์ JEG-3 โดยวิธี ICP-MS หลังจากเซลล์ได้รับแคดเมียมความเข้มข้นต่างๆ (3.125, 12.5, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์) (*, #, § แสดงค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับแคดเมียมความเข้มข้น 3.125 และ 12.5 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ) (ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SD ของชุดข้อมูล 2 ชุด)

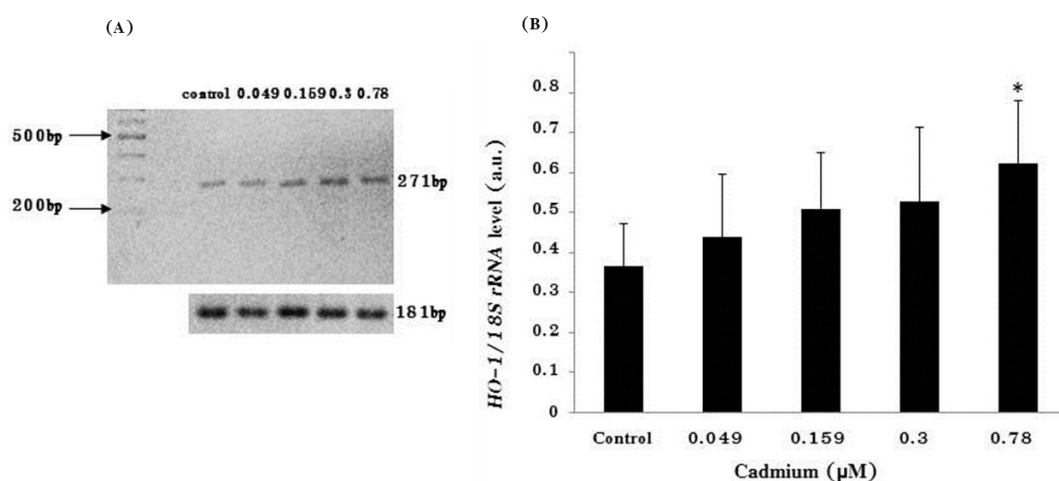


นอกจากนี้พบว่า การแสดงออกของยีน *MT* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมความเข้มข้น 0.159, 0.3 และ 0.78 ไมโครโมลาร์ (รูปที่ 3) ส่วนการแสดงออกของยีน *HO-1*

พบว่าการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เฉพาะในเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมความเข้มข้น 0.78 ไมโครโมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4)



รูปที่ 3 (A) ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *MT* (68bp) และยีน *18S rRNA* (181bp) ด้วยเทคนิค RT-PCR บน 2% agarose gel ของเซลล์ JEG-3 ที่ได้รับแคดเมียมความเข้มข้นต่างๆ (0.049, 0.159, 0.3 และ 0.78 ไมโครโมลาร์) และ (B) กราฟการแสดงออกของยีน *MT* (จากการวัดความเข้มของแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีการ densitometry analysis โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ภาพถ่าย imageJ) ของเซลล์ JEG-3 ที่ได้รับแคดเมียมความเข้มข้นต่างๆ กัน (*, #, \$, ξ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม control และกลุ่มที่ได้รับแคดเมียมความเข้มข้น 0.049, 0.159 และ 0.3 ไมโครโมลาร์ตามลำดับ) (ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SD ของชุดข้อมูล 2 ชุด)



รูปที่ 4 (A) ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *HO-1* (271bp) และยีน *18S rRNA* (181bp) ด้วยเทคนิค RT-PCR บน 2% agarose gel ของเซลล์ JEG-3 ที่ได้รับแคดเมียมความเข้มข้นต่างๆ (0.049, 0.159, 0.3 และ 0.78 ไมโครโมลาร์) และ (B) กราฟการแสดงออกของยีน *HO-1* (จากการวัดความเข้มของแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีการ densitometry analysis โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ภาพถ่าย imageJ) ของเซลล์ JEG-3 ที่ได้รับแคดเมียมความเข้มข้นต่างๆ กัน (* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม control) (ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SD ของชุดข้อมูล 2 ชุด)

อภิปรายผลการศึกษา

จากผลจากการศึกษาเซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์รก JEG-3 สามารถนำแคดเมียมเข้าสู่ภายในเซลล์ได้เพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของแคดเมียมที่สูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Lin, et al. (1997) และแคดเมียมที่ได้รับมีผลต่ออัตราการอยู่รอดของเซลล์ โดยพบว่าเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมความเข้มข้นสูง (3.125–12.5 ไมโครโมลาร์) ทำให้เซลล์มีอัตราการอยู่รอดน้อยกว่าเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมความเข้มข้นต่ำ (0.049–0.78 ไมโครโมลาร์) มีผลการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าแคดเมียมสามารถเหนี่ยวนำทำให้เซลล์เกิดการตายได้โดยผ่านกระบวนการอะพอพโทซิส (apoptosis) และ/หรือเนโครซิส (necrosis) (Di Sant'Agnese, et al., 1983; Hamada, Tanimoto, & Sasaguri, 1997; Lohmann, & Beyersmann, 1994; Prozialeck, & Lamar, 1995; Xu, et al., 1996) ทั้งนี้ผลที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์โดยทั้งสองกระบวนการนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและระยะเวลาที่เซลล์ได้รับแคดเมียม และชนิดของเนื้อเยื่อที่ใช้ในการศึกษา (Hamada, et al., 1997) จากผลการศึกษาโดย Di Sant'Agnese, Jensen, Levin, & Miller, (1983) พบว่าเมื่อนำเซลล์รกชนิด โทรโฟบลาสต์ (trophoblast) ของหนูมาฉีดด้วยแคดเมียมที่มีความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ส่งผลให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส โดยพบการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอลัสและมีการจับตัวเป็นก้อนของโครมาติน และจากการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์รก JEG-3 พบว่าทั้งเซลล์กลุ่มควบคุมและเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมความเข้มข้นต่ำ (0.04–0.64 ไมโครโมลาร์) มีการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสในระดับต่ำ (ร้อยละ 5) เท่ากัน (Lin, et al., 1997) สำหรับการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทำการตรวจสอบการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ แต่พบว่าเซลล์ที่ได้รับแคดเมียมความเข้มข้นสูง (≥ 3.125 ไมโครโมลาร์) มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นรูปกระสวยหรือทรงกลม และมีการหลุดออกจากพื้นผิวภาชนะและเซลล์ที่อยู่รอบข้าง เมื่อเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับแคดเมียม (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Lin, et al. (1997) นอกจากนี้ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าค่า IC_{50} ของเซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์รกค่อนข้างต่ำ (0.878 ไมโครโมลาร์) ซึ่งแตกต่างจากผลการศึกษาในเซลล์ประเภทอื่น โดยมีรายงานการศึกษาในเซอร์โทไล (sertoli cells) ซึ่งเป็นเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างตัวสุจิ พบว่าเมื่อเซลล์ได้รับแคดเมียมความเข้มข้นต่างๆ (0.0975–100 ไมโครโมลาร์) เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จะมีค่า IC_{50} เท่ากับ 9.6 ไมโครโมลาร์ (Kusakabe, et al., 2008) และจากรายงานการศึกษาในเซลล์มะเร็งตับ (HepG2) ที่ได้รับแคดเมียม (ความเข้มข้น 5, 10 และ 50 ไมโครโมลาร์) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 13.96 ไมโครโมลาร์ (Lawal, & Ellis, 2010) จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์รก JEG-3 เป็นเซลล์ที่มีความไวต่อการตอบสนองเมื่อเซลล์ได้รับแคดเมียมที่มีความเข้มข้นต่ำๆ

มีรายงานผลการศึกษาพบว่าแคดเมียมสามารถผ่านเข้าสู่เซลล์เนื้อเยื่อกระดูกได้ทางช่องแคลเซียมไอออนชนิดแอล (L-type Ca^{2+} channel) (Hinkle, Kinsella, & Osterhoudt, 1987) และสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อกระดูก (Ronco, et al., 2005; Korpela, Loueniva, Yrjanheikki, & Kauppila, 1986; Osman, et al., 2000) ทำให้มีผลต่อการทำงานของกระดูกและการเจริญเติบโตของทารกในครรภ์ เช่น ลดการขนส่งธาตุสังกะสีไปสู่ทารกในครรภ์ (Kippler, et al., 2010; Ronco, et al., 2006) ลดการสังเคราะห์ฮอร์โมนฮิวแมนคอร์ริโอนิกโกนาโดโทรฟิน (human chorionic gonadotropin) (Wier, Miller, Maulik, & Di Sant'Agnese, 1990) และโปรเจสเตอโรน (progesterone) (Jolibois, Shi, George, Henson, & Anderson, 1999) นอกจากนี้แคดเมียมยังมีผลทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันเพิ่มขึ้น โดยแคดเมียมในร่างกายที่อยู่ในรูป Cd^{2+} จะจับกับหมู่ไธออล (thiol) ของโปรตีนกลูตาไธโอน (GSH) ได้ดี เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน $Cd-GSH$ กลูตาไธโอนเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญภายในเซลล์ดังนั้นหากเซลล์ได้รับแคดเมียมในปริมาณสูงก็จะจับกับ GSH ได้มากขึ้นส่งผลให้ปริมาณ GSH ในเซลล์ลดลง เกิดความไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระจนทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Lopez, et al., 2006) เกิดการออกซิไดซ์ ไขมันเลกุลขนาดใหญ่ภายในเซลล์ เช่น โปรตีน ดีเอ็นเอ และทำให้เกิดกระบวนการ lipid



peroxidation ส่งผลให้เซลล์ถูกทำลาย (Dally, & Hartwig, 1997) Cd^{2+} ยังสามารถจับกับหมู่ไทโธลของกรดอะมิโนซิสเทอีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบจำนวนมากในโมเลกุลของโปรตีน MT เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน Cd-MT (Klaassen, et al., 1999) ดังนั้นโปรตีน MT จึงมีบทบาทในการป้องกันเซลล์และอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกายจากพิษของแคดเมียม (Kondo, et al., 1995) มีรายงานผลการศึกษาในเนื้อเยื่อของมนุษย์แสดงให้เห็นว่ายีนเมธิลโฮอีโอนินจะถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีนและโปรตีนเพิ่มมากขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับแคดเมียม (Kippler, et al., 2010; Ronco, et al., 2005; Lin, et al., 1997) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าเมื่อเซลล์ JEG-3 ได้รับแคดเมียมที่มีความเข้มข้นต่ำ (0.159, 0.3 และ 0.78 ไมโครโมลาร์) จะสามารถเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีน MT เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีความไวในการตอบสนองต่อแคดเมียมที่มีความเข้มข้นต่ำ ๆ และการเพิ่มการสร้างโปรตีน MT ในเซลล์รกเป็นการช่วยป้องกันไม่ให้แคดเมียมผ่านจากแม่เข้าไปสู่ทารกในครรภ์ (Kippler, et al., 2010)

นอกจากแคดเมียมจะกระตุ้นการแสดงออกของยีน MT เพื่อลดพิษของแคดเมียมภายในเซลล์รกแล้ว พบว่าแคดเมียมยังสามารถเหนี่ยวนำให้มีการกระตุ้นการแสดงออกของยีน HO-1 ในเซลล์รกของมนุษย์ได้ (Yamada, et al., 2009) โปรตีน HO-1 มีหน้าที่เป็นเอนไซม์ในการสลายฮีมภายในเซลล์ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ บิลิเวอร์ดิน (biliverdin) และบิลิรูบิน (bilirubin) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Stocker, 2004), ferrous ion (Fe^{2+}) กระตุ้นการสร้างโปรตีนเฟอร์ริติน (ferritin) ให้มีการจับกับ Fe^{2+} เพื่อลดการเกิดอนุมูลอิสระ (Galaris, & Pantopoulos, 2008) และคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO) มีฤทธิ์ช่วยต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) (Sawle, et al., 2005; Ning, Choi, & Li, 2005) โปรตีน HO-1 จึงอาจเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญในการปกป้องเซลล์จากภาวะเครียดออกซิเดชัน จากรายงานการศึกษาของ Yang, Julian, Rubio, Sharma, & Guan, (2006) พบว่าเซลล์รกที่ได้จากเนื้อเยื่อรกแรกคลอดของมนุษย์ เมื่อได้รับแคดเมียมที่มีความเข้มข้น 0.25-1 ไมโครโมลาร์

เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จะมีการแสดงออกของยีน HO-1 เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของแคดเมียมที่ได้รับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์รก JEG-3 มีการแสดงออกของยีน HO-1 เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม หลังจากที่ได้รับแคดเมียมความเข้มข้น 0.78 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นการแสดงออกของยีน HO-1 อาจช่วยป้องกันอันตรายแก่เซลล์จากภาวะเครียดออกซิเดชันจากแคดเมียม (Kataranovski, et al., 2009; Chen, et al., 2008) อย่างไรก็ตามควรทำการศึกษากการแสดงออกของยีนและ/หรือโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันของเซลล์จากการได้รับแคดเมียม ได้แก่ heat shock protein 70 (HSP70) (Koizumi, Yokota, & Shirakura, 1994) และ nuclear factor erythroid 2 related factor 2 (Nrf2) (Chen, et al., 2008) จากผลการศึกษาครั้งนี้จะเห็นได้ว่าการกระตุ้นการแสดงออกของยีน MT และ HO-1 เมื่อเซลล์ได้รับแคดเมียมที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ นั้นมีความแตกต่างกันโดยที่ ยีน MT จะมีระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นประมาณ 1.9-2.7 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่ยีน HO-1 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นประมาณ 1.7 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของยีน MT จะถูกกระตุ้นด้วยแคดเมียมที่มีความเข้มข้นต่ำ (0.159 ไมโครโมลาร์) ส่วนยีน HO-1 จะถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีนที่มีความเข้มข้นของแคดเมียมที่สูงกว่า (0.78 ไมโครโมลาร์) แสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นการแสดงออกของยีน MT อาจใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของการตอบสนองของเซลล์รกเมื่อได้รับพิษจากสารโลหะหนักแคดเมียม

สรุปผลการศึกษา

แคดเมียมสามารถเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์รก JEG-3 ทำให้เกิดการสะสมแคดเมียมเพิ่มมากขึ้นภายในเซลล์ และลดอัตราการอยู่รอดของเซลล์ เมื่อเซลล์ได้รับแคดเมียมเซลล์จะตอบสนองโดยการกระตุ้นการแสดงออกของยีน MT และ HO-1 เพิ่มมากขึ้น ทั้งยีน



MT และ HO-1 เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการปกป้องเซลล์จากพิษของแคดเมียม เซลล์รกในคนมีหน้าที่สำคัญในการป้องกันสารพิษต่างๆ ไม่ให้ผ่านเข้าไปสู่ทารก เนื่องจากอาจมีผลต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของทารกในครรภ์ได้ ดังนั้นข้อมูลพื้นฐานที่ได้จากผลการศึกษานี้ อาจมีประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจ และ/หรือหน่วยงานต่างๆ ที่เกี่ยวข้องเพื่อนำไปเผยแพร่ให้รับทราบพิษของแคดเมียมที่มีต่อเซลล์รก และกลไกที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองภายในเซลล์รกเพื่อป้องกันเซลล์จากพิษของแคดเมียม อันอาจช่วยเป็นแนวทางในการป้องกันปรับปรุง และพัฒนาคุณภาพชีวิตโดยเฉพาะกลุ่มหญิงตั้งครรภ์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน กองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2556

เอกสารอ้างอิง

- Barbier, O., Jacquillet, G., Tauc, M., Cougnon, M., & Poujeol, P. (2005). Effect of heavy metals on, and handling by, the kidney. *Nephron Physiology*, 99, 105–110.
- Chen, L., Liu, L., & Huang, S. (2008). Cadmium activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway via induction of reactive oxygen species and inhibition of protein phosphatases 2A and 5. *Free Radical Biology & Medicine*, 45(7), 1035–1044.
- Dally, H., & Hartwig, A. (1997). Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel (II) and cadmium (II) in mammalian cells. *Carcinogenesis*, 18, 1021–1026.
- Di Sant'Agnesse, P. A., Jensen, K. D., Levin, A., & Miller, R. K. (1983). Placental toxicity of cadmium in the rat: an ultrastructural study. *Placenta*, 4, 149–164.
- Fowler, B. A. (2009). Monitoring human populations for early markers of cadmium toxicity: a review. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238, 294–300.
- Galaris, D., & Pantopoulos, K. (2008). Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 45, 1–23.
- Godt, J., Scheidig, F., Grosse-Siestrup, C., Esche, V., Brandenburg, P., & Reich, A., et al. (2006). The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 10, 1–22.
- Goyer, R. A., Haust, M. D., & Cherian, M. G. (1992). Cellular localization of metallothionein in human term placenta. *Placenta*, 13, 349–355.
- Hamada, T., Tanimoto, A., & Sasaguri, Y. (1997). Apoptosis induced by cadmium. *Apoptosis*, 2, 359–367.
- Hanlon, D. P., Ferm, V. H., & Mc Lain, G. S., (1989). Cadmium disposition following repeated exposure in the pregnant hamster. *Reproductive Toxicology*, 3, 51–57.
- Harstad, E. B., & Klaassen, C. D. (2002). Analysis of strain difference in sensitivity to cadmium-induced hepatotoxicity in Fischer 344 and Sprague-Dawley rats. *Toxicological Sciences*, 67(2), 329–40.



- Hinkle, P. M., Kinsella, P. A., & Osterhoudt, K. C. (1987). Cadmium uptake and toxicity via voltage-sensitive calcium channels. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 16333–16337.
- Jarup, L., Berglund, M., Elinder, C. G., & Vahter, M. (1998). Health effects of cadmium exposure—a review of the literature and a risk estimate. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 24(1), 1–51.
- Jolibois, L. S. Jr., Shi, W., George, W. J., Henson, M. C., & Anderson, M. B. (1999). Cadmium accumulation and effects on progesterone production by cultured human trophoblast cells. *Reproductive Toxicology*, 13, 215–221.
- Kataranovski, M., Mirkov., I., Belij, S., Nikolic, M., Zolotarevski, L., & Ciric, D., et al. (2009). Lungs: remote inflammatory target of systemic cadmium administration in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28(2), 225–231.
- Kippler, M., Hoque, A.M., Raqib, R., Ohrvik, H., Ekström, E. C., & Vahter, M. (2010). Accumulation of cadmium in human placenta interacts with the transport of micronutrients to the fetus. *Toxicology Letters*, 192(2), 162–168.
- Kitajima, H., Hirano, S., & Suzuki, K. T. (1999). Upregulation of heme oxygenase gene expression in rat lung epithelial cells following exposure to cadmium. *Archives of Toxicology*, 73(7), 410–2.
- Klaassen, C., Liu, J., & Choudhuri, S. (1999). Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39, 267–294.
- Koizumi, T., Yokota, T., & Shirakura, H. (1994). Potential mechanism of cadmium-induced cytotoxicity in rat hepatocytes: inhibitory action of cadmium on mitochondrial respiratory activity. *Toxicology*, 92, 115–125.
- Kondo, Y., Woo, E. S., Michalska, A. E., Choo, K. H. A., & Lazo, J. S. (1995). Metallothionein null cells have increased sensitivity to anticancer drugs. *Cancer Research*, 55, 2021–2023.
- Korpela, H., Loueniva, R., Yrjanheikki, E., & Kauppila, A. (1986). Lead and cadmium concentrations in maternal and umbilical cord blood, amniotic fluid, placenta, and amniotic membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 155, 1086–1089.
- Kusakabe, T., Nakajima, K., Nakazato, K., Suzuki, K., Takada, H., & Satoh, T., et al. (2008). Changes of heavy metal, metallothionein and heat shock proteins in Sertoli cells induced by cadmium exposure. *Toxicology In Vitro*, 22(6), 1469–1475.
- Lai, C., & Loo, G. (2011). Cellular iron depletion weakens induction of heme oxygenase-1 by cadmium Cellular iron depletion weakens induction of heme oxygenase-1 by cadmium. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43, 88–97.
- Lawal, A. O., & Ellis, E. (2010). Differential sensitivity and responsiveness of three human cell lines HepG2, 1321N1 and HEK293 to cadmium. *The Journal of Toxicological Sciences*, 35(4), 465–478.



- Leoni, G., Bogliolo, L., Deiana, G., Berlinguer, F., Rosati, I., & Pintus, P. P., et al. (2002). Influence of cadmium exposure on *in vitro* ovine gamete dysfunction. *Reproductive Toxicology*, 16, 371–377.
- Lin, F. L., Fitzpatrick, J. W., Iannotti, C. A., Martin, D. S., Mariani, B. D., & Tuan, R. S. (1997). Effects of cadmium on trophoblast calcium transport. *Placenta*, 18(4), 341–56.
- Llanos, M. N., & Ronco, A. M., (2009). Fetal growth restriction is related to placental levels of cadmium, lead and arsenic but not with antioxidant activities. *Reproductive Toxicology*, 27(1), 88–92.
- Lohmann, R. D., & Beyersmann, D. (1994). Effects of zinc and cadmium on apoptotic DNA fragmentation isolated bovine liver nuclei. *Environmental Health Perspective*, 102, 269–271.
- López, E., Arce, C., Oset-Gasque, M.J., Cañadas, S., & González, M.P. (2006). Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free Radical Biology and Medicine*, 40, 940–951.
- Muntau, H., & Baudo, R. (1992). Sources of cadmium, its distribution and turnover in the freshwater environment. *IARC Scientific Publications*, 118, 133–148.
- Ning, W., Choi, A. M., & Li, C. (2005). Carbon monoxide inhibits IL-17-induced IL-6 production through the MAPK pathway in human pulmonary epithelial cells. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 289, L268–273.
- Osman, K., Akesson, A., Berglund, M., Bremme, K., Schutz, A., & Ask, K., et al. (2000). Toxic and essential elements in placentas of Swedish women. *Clinical Biochemistry*, 33(2), 131–138.
- Ossola, J. O., & Tomaro, M. L. (1995). Heme oxygenase induction by cadmium chloride: evidence for oxidative stress involvement. *Toxicology*, 104 (1–3), 141–147.
- Prozialeck, W. C., & Lamar, P. C. (1995). Effects of glutathione depletion on the cytotoxic actions of cadmium in LLC-PK1 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 134, 285–295.
- Reproductive and Cancer Hazard Assessment Section (RCHAS) (1996). *Evidence on developmental and reproductive toxicity of cadmium (SAB DART ID Committee Draft)*. *Reproductive and cancer hazard assessment (OEHHA)*. California environmental protection agency (Cal/EPA). Retrieved December, 13, 2013, from <http://oehha.ca.gov/prop65/pdf/CD-HID.pdf>
- Ronco, A. M., Garrido, F., & Llanos, M. N. (2006). Smoking specifically induces metallothionein-2 isoform in human placenta at term. *Toxicology*, 223, 46–53.
- Ronco, A. M., Arguello, G., Munoz, L., Gras, N., & Llanos, M. N. (2005). Metals content in placentas from moderate cigarette consumers: correlation with newborn birth weight. *Biometals*, 18, 233–241.
- Ronco, A. M., Urrutia, M., Montenegro, M., & Llanos, M. N. (2009). Cadmium exposure during pregnancy reduces birth weight and increases maternal and foetal glucocorticoids. *Toxicology Letters*, 188(3), 186–191.



- Satarug, S., & Moore, M. R. (2004). Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environmental Health Perspectives*, 112(10), 1099–1103.
- Sawle, P., Foresti, R., Mann, B. E., Johnson, T. R., Green, C. J., & Motterlini, R. (2005). Carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs) attenuate the inflammatory response elicited by lipopolysaccharide in RAW264.7 murine macrophages. *British Journal of Pharmacology*, 145, 800–810.
- Sorell, T. L., & Graziano, J. H. (1990). Effect of oral cadmium exposure during pregnancy on maternal and fetal zinc metabolism in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 102, 537–545.
- Stocker, R. (2004). Antioxidant activities of bile pigments. *Antioxidant & Redox Signaling*, 6(5), 841–9.
- Stulc, J., Stulcova, B., & Svihovec, J. (1990). Transport of calcium across the dually perfused placenta of the rat. *Journal of Physiology (London)*, 420, 295–311.
- Takeda, K., Ishizawa, S., Sato, M., Yoshida, T., & Shibahara, S. (1994). Identification of a *cis*-acting element that is responsible for cadmium-mediated induction of the human heme oxygenase gene. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 22858–22867.
- Thévenod, F. (2009). Cadmium and cellular signaling cascades: to be or not to be? *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(3), 221–239.
- Tokumoto, M., Lee, J. Y., Fujiwara, Y., & Satoh, M. (2013). DNA microarray expression analysis of mouse kidney following cadmium exposure for 12 months. *Journal of Toxicological Sciences*, 38(5), 799–802.
- Webster, W.S. (1978) Cadmium-induced fetal growth retardation in the mouse. *Archives of Environmental Health*, 33, 36–42.
- World Health Organization. (1989). In: Proceedings of the thirty-third report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. Evaluation of certain food additives and contaminants. World Health Organization, Geneva, WHO Technical Report Series, 776, 28–31.
- World Health Organization. (1993). In: Proceedings of the forty-first report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. Evaluation of certain food additives and contaminants. World Health Organization, Geneva, WHO Technical Report Series, 32, 28–30.
- Wier, P. J., Miller, R. K., Maulik, D., & Di Sant'Agnese, P. A. (1990). Toxicity of cadmium in the perfused human placenta. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 105, 156–71.
- Xu, C., Johnson, J. E., Singh, P. K., Jones, M. M., Yan, H., & Cater, C. E. (1996). In vivo studies of cadmium-induced apoptosis in testicular tissue of the rat and its modulation by a chelating agent. *Toxicology*, 107, 1–8.
- Yamada, H., Uenishi, R., Suzuki, K., & Koizumi, S. (2009). Cadmium induced alterations of gene expression in human cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28(1), 61–69.



- Yang, K., Julian, L., Rubio, F., Sharma, A., & Guan, H. (2006). Cadmium reduces 11-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity and expression in human placental trophoblast cells. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 290, E135–E142.
- Yoshida, T., Biro, P., Cohen, T., Muller, R. M., & Shibahara, S. (1988). Human heme oxygenase cDNA and induction of its mRNA by hemin. *European Journal of Biochemistry*, 171(3), 457–461.
- Yu, H. S., Tam, P. P. L., & Chan, S. T. H. (1985). Effects of cadmium on pre-implantation mouse embryos *in vitro* with special reference to their implantation capacity and subsequent development. *Teratology*, 32(3), 347–353.